

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
REINIGUNG UND KONZENTRIERUNG
DES AUSTRALIA-ANTIGENS
ZUR HERSTELLUNG VON
MONOSPEZIFISCHEN ANTISEREN**

Bahram Abar

1973

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. phil. nat., Dr. med. H. Eyer

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE REINIGUNG UND KONZENTRIERUNG
DES AUSTRALIA-ANTIGENS ZUR HERSTELLUNG VON
MONOSPEZIFISCHEN ANTISEREN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des
Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Diplom-Biologe Bahram Abar

aus

Teheran/Iran

München 1973

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K.H. Schleifer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 3.12.1973



Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>EINLEITUNG</u>	1
1. Historischer Überblick	1
2. Vorkommen des Australia-Antigens	2
2.1 Bei der gesunden Bevölkerung	2
2.2 Bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen	3
2.3 Bei Patienten mit Virushepatitis	4
3. Methoden zum Nachweis des Australia-Antigens	4
3.1 Immunodiffusionstest (IDT) nach OUCHTERLONY	5
3.2 Elektrophoretische Präzipitationsmethoden	6
3.3 Komplementbindungsreaktion (KBR)	7
4. Aussehen und biophysikalisches Verhalten des Australia-Antigens	9
4.1 Morphologie und Größe	9
4.2 Dichte, Molekulargewicht und Sedimentationskonstante	10
4.3 Verhalten gegenüber physikalischen Einflüssen	10
4.4 Verhalten gegenüber chemischen Einflüssen	11
B. <u>PROBLEMSTELLUNG</u>	13
1. Die möglichen Verfahren zur Reindarstellung	13
1.1 Ausschleudern durch Ultrazentrifugation	14
1.2 Trennung durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation	15
1.3 Trennung durch Gelfiltration	15
1.4 Ausfällung durch Verminderung der Löslichkeit	17
2. Möglichkeiten zur Prüfung des Reinheitszustandes	18

	<u>Seite</u>
C. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	20
1. Material	20
1.1 Sammeln von Australia-Antigen-haltigem Material	20
1.1.1 Australia-Antigen-haltiges Material von gesunden Blutspendern	20
1.2 Antiseren	21
1.2.1 Anti-Australia-Antigen-Seren	21
1.2.2 Anti-Human-Serum	22
2. Methoden	22
2.1 Methoden zum Nachweis des Australia-Antigens	22
2.1.1 Immunodiffusionstest nach OUCHTERLONY (IDT)	22
2.1.2 Elektrophoretischer Präzipitationstest (EPT)	23
2.1.3 Komplementbindungs-Reaktion (KBR)	24
2.2 Methoden zur Reinigung und Konzentrierung von Australia-Antigen aus Plasma und Serum	25
2.2.1 Fraktionierte Ausfällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung	25
2.2.2 Frigenbehandlung stark lipämischer Proben	25
2.2.3 Gelfiltration mit Sephadex G 200 und Sepharose 4 B	26
2.2.4 Konzentrierung der Fraktionen	30
2.2.5 Dichtegradienten-Zentrifugation	33
2.3 Prüfung des Reinheitszustandes mittels Immunelektrophorese	34
2.4 Versuch der Herstellung von monospezifischen Anti-Australia-Antigen-Seren	36
2.4.1 Verwendung von Freund'schem Adjuvans und Versuch, eine Immun-Toleranz zu erreichen	36
2.4.2 Normale Immunisierung ohne Verwendung von Adjuvans und ohne Injektionen zur Erzielung einer Immun-Toleranz	37
2.5 Dokumentation der Präzipitationen im Agar	37

	<u>Seite</u>
2.5.1 Photographie der Nativpräparate in Flüssigkeit	37
2.5.2 Haltbarmachung	38
3. Ergebnisse	40
3.1 Isolierung und Anreicherung des Australia- Antigens durch fraktionierte Ammonium- sulfatfällung	40
3.1.1 Fällungsprozedur und Wiederherstellung des physiologischen Zustandes	40
3.1.2 Nachweis des Australia-Antigens	40
3.2 Versuche, das Au-Ag durch Säulenchromato- graphie abzutrennen und zu konzentrieren	42
3.2.1 Trennung durch Sephadex G 200	42
3.2.1.1 Feststellung des Antigenvor- kommens in den verschiedenen Fraktionen nach unterschiedli- chen Konzentrierungsmethoden	48
3.2.1.2 Versuche der Reindarstellung des Au-Ag durch Ausfällung der Begleitproteine	53
3.2.1.3 Dichtegradientenzentrifugation	56
3.2.2 Trennung durch kombinierte Chromato- graphie (mit Sephadex G 200 und an- schließend mit Sepharose 4 B)	62
3.2.2.1 Trennung durch Sephadex G 200	62
3.2.2.2 Trennung durch Sepharose 4 B	64
3.2.2.3 Antigenvorkommen in den Aga- rose-chromatographierten Fraktionen	69
3.2.2.4 Untersuchung des Reinheits- grades der doppelchromatogra- phierten Proben	70
3.3 Resultate der Immunisierungen von Meerschweinchen	75
3.3.1 Tiere, denen ein Antigen-Adjuvansge- misch und intracardial Euglobuline injiziert wurde	75
3.3.2 Normal immunisierte Tiere	76

	<u>Seite</u>
D. <u>DISKUSSION</u>	88
E. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	99
F. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	101

A. E I N L E I T U N G

1. Historischer Überblick

1961 wurde von ALLISON und BLUMBERG (1) über einen anämischen Patienten berichtet, der über 50 Bluttransfusionen erhalten hatte und dessen Serum im Agardoppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY mit den Seren der Mitglieder einiger gesunder Familien aus den USA und aus Mikronesien stark präzipitierte.

Es wurde weiterhin beschrieben, daß das Antigen ein Alpha-2-Globulin-ähnliches Partikel und dessen Präzipitin ein 7 S-Gamma-Globulin sei. Die Häufigkeit des Vorkommens des Antigens in der Bevölkerung war von Kollektiv zu Kollektiv verschieden und wurde als genetisch bedingt angesehen.

Auf der Suche nach weiteren Isopräzipitinen, bei denen die Seren vielfachtransfundierter Patienten gegen die Seren von Normalpersonen verschiedener Herkunft getestet wurden, beschrieben BLUMBERG et al. 1964 (18) ein Lipoprotein, das sehr häufig bei Mikronesiern, Vietnamesen, australischen Ureinwohnern und Leukämie-Patienten zu finden war. 1965 erwähnten dieser Autor und Mitarbeiter (19) erstmals die Bezeichnung Australia-Antigen (= Au-Ag) für eine Substanz im Serum eines australischen

Ureinwohners, die von zwei Hämophilen-Seren stark präzipitiert wurde.

Die genetische Determinierung des Auftretens des Au-Ag wurde bis 1967 bei einer Reihe von Erkrankungen wie Leukämie, Mongolismus, lepromatöser Lepra und sogar Hepatitis (16, 20, 21, 22, 24) in Betracht gezogen.

1968 wurde von PRINCE (71) das "SH-Antigen" beschrieben, das bei Hepatitiskranken in der Inkubationszeit auftrat. 1969 folgten die Publikationen von GÖCKE et al. (39, 40), die ein "Hepatitis-Antigen" bei Patienten in der akuten Krankheitsphase feststellten. Beide Antigene erwiesen sich später als identisch mit dem Au-Ag. Dadurch wurde die enge Verbindung des Antigens mit der Virus-Hepatitis offensichtlich, was zu dem großen Interesse weiter Kreise an seiner Erforschung führte.

2. Vorkommen des Australia-Antigens

2.1 Bei der gesunden Bevölkerung

In zahlreichen Veröffentlichungen ist das je nach Rasse und geographischer Lage verschieden häufige Vorkommen des Au-Ag in der Normalbevölkerung der Erde beschrieben worden.

Bei der Untersuchung von Seren eines peruanischen Indianerstammes fand man 20,2% Au-Ag-positive Proben, in Taiwan 13%, in Ghana 9,5%, in Mikronesien 7,2%, in Vietnam 6,3% und auf den Philippinen 4,6 - 4,8% (23, 25).

In der Normalbevölkerung europäischer Länder kommt das Au-Ag unterschiedlich häufig vor (0,1 - 1,8%).

In der BRD wurden 0,06% (54) bei Berlinern, 0,46% (51) bei Göttingern und 0,4% (44) bei Münchner Blutspendern festgestellt.

Bei der Normalbevölkerung der USA wird das Vorkommen des Au-Ag mit 0 - 0,25% (23, 82, 90) und mehr angegeben.

2.2 Bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen

Sehr häufig wurde das Au-Ag bei Mongoloiden (10) nachgewiesen, die in großen Institutionen untergebracht waren. Dagegen war das Antigen bei den gleichen Patienten, die in kleineren Heimen oder zu Hause lebten, weniger häufig zu beobachten (84). Ferner konnten 6,7 - 9,8% Au-Ag-Träger unter Patienten mit bestimmten Leukämie-Formen festgestellt werden (25).

Ferner wurden 9,4% Positive bei Kranken mit lepromatöser Lepra nachgewiesen (22). Häufungen von Antigen-Trägern finden sich außerdem oft bei Personen, die sich Hämodia-

lysebehandlungen unterziehen müssen (76, 87) und bei Patienten mit Hämophilie oder Thalassaemie, die zahlreiche Bluttransfusionen erhalten (15, 21).

2.3 Bei Patienten mit Virushepatitis

Die Assoziation des Au-Ag mit der akuten Virus-Hepatitis mit langer Inkubationszeit (der sogenannten Serumhepatitis oder Hepatitis B) ist durch zahlreiche Beobachtungen der letzten Jahre belegt worden (2, 8, 37, 38, 39, 71, 86) und gilt heute als eindeutig erwiesen.

3. Methoden zum Nachweis des Australia-Antigens

Wie schon erwähnt, wurde anfangs das Au-Ag mit der Agargel-Doppeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY festgestellt (17). Im Laufe der Zeit sind weitere Verfahren wie elektrophoretischer Präzipitationstest, Komplementbindungsreaktion, Latex-Agglutination, Thrombocytenaggregation, indirekte Hämagglutination, Radioimmuntest und Elektronenmikroskopie eingeführt worden.

Die Empfindlichkeit, Spezifität und insbesondere der Zeit- und technische Aufwand für den Antigen-Nachweis sind bei den einzelnen Methoden sehr unterschiedlich.

Nur einige dieser Verfahren kommen deshalb für den routinemäßigen Au-Ag-Nachweis zur Anwendung.

3.1 Immunodiffusionstest (IDT) nach OUCHTERLONY

1946 wurden von OUDIN (67) die Grundlagen der Immuno-
diffusion und ihre Bedeutung zusammenfassend dargestellt.
OUCHTERLONY's Arbeiten (61-66) zur Klärung der methodi-
schen und theoretischen Fragen der linearen und radia-
len Doppeldiffusion ließ die besondere Eignung dieser
eleganten Methode für die Charakterisierung, Identifi-
zierung und Differenzierung von Antigenen erkennen. Die
Präzipitatbildung findet bei diesem Test im Agargel
statt. Dessen Konzentration wird so gewählt, daß nach
dem Erstarren des Gels eine schnittfeste Schicht ent-
steht.

BLUMBERG und Mitarbeiter (17) verwendeten 1%igen Oxoid
Ionenagar in 0,7 M Phosphatpuffer, pH 7,4. Später wur-
de von PRINCE (72) 1%ige Agarose mit einem Puffer von
pH 7,6 eingeführt, der aus 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris
(Hydroxymethyl)-Aminomethan, 0,001 M EDTA (Äthylendia-
mintetraessigsäure) und 0,1% Protamin-Sulfat hergestellt
wird. Eine Reduzierung der Agarosekonzentration bis auf
0,45% in einem Puffer von 0,1 M NaCl, 0,05 M 2-Amino-2
(hydroxymethyl)-1,3-Propanediol (Tris) pH 8 wurde von

Le BOUVIER (55) vorgenommen, die möglicherweise eine Beschleunigung des Diffusionsvorgangs mit sich bringt.

Der Nachteil des OUCHTERLONY-Testes liegt in der langen Diffusionszeit, die eine Bewertung erst nach ein bis mehreren Tagen zuläßt.

Durch Verkürzung der Diffusionsstrecken versuchten BECKER et al. (13) eine schnellere und empfindlichere Präzipitationsreaktion mit Au-Ag zu erreichen.

3.2 Elektrophoretische Präzipitationsmethoden

Die Eiweiße sind entsprechend ihrem chemischen Aufbau in gelöster Form polyvalente Ionen, die je nach Überwiegen ihrer freien Amino- bzw. Carboxylgruppen und der Wasserstoff-Ionen-Konzentration des Lösungsmittels unterschiedlich geladen sein können. Sie lassen sich in einem wässrigen elektrischen Feld mobilisieren und werden je nach elektrischer Ladung bzw. Ionenstärke des Mediums schnell oder langsam zur Anode oder Kathode geführt. Auf Grund dieser Eigenschaft wurden verschiedene Methoden für die Reindarstellung, Identifizierung und Differenzierung der Proteine entwickelt. Eine dieser Methoden ist die "Elektrosynärese", die 1959 von BUSSARD (27) beschrieben wurde. Die hierbei präzipitierenden An-

tigene und Antikörper treffen nicht durch Diffusion sondern durch ihre Wanderung im elektrischen Feld aufeinander. Später wurde dieser Vorgang von HAAN und LANG (42) als "Überwanderungselektrophorese" bezeichnet und zum Nachweis der Reaktion von radioaktiv markierten Antigenen und Antikörpern benutzt.

Alle elektrophoretischen Präzipitations-Methoden, die zum Nachweis des Au-Ag benutzt wurden, beruhen auf dem gleichen Prinzip. PESENDORFER et al. (68) benützten diese "Überwanderungselektrophorese" mit entsprechendem Puffer (Barbital-Na-actetat-Puffer, pH 8,1) und Träger (2,5%igen Spezial-Agar-Nobel). PRINCE und Mitarbeiter (73) verwendeten für ihre Immunoelktrophorese Hochspannung mit entsprechender Kühlungsvorrichtung und einen Na-Barbitalpuffer von pH 8,6-8,8 in 1%iger Agarose.

GÖCKE und HOWE (40) benützten für ihre "Counterimmunoelktrophorese" 0,85%ige Agarose in 0,05 M Veronal-Puffer pH 8,2.

3.3 Komplementbindungsreaktion (KBR)

Der spezifischen Bindung des Komplements mit Antigen und homologem Antikörper zu einem (50) Immunkomplex kommt in

der Mikrobiologie und Immunologie große Bedeutung zu. Benützt wird sie u.a. zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Antigenen und Antikörpern. Die erfolgte Komplementbindung wird durch ein zweites System, das als Indikator dient, sichtbar gemacht. Es besteht aus Schaf-Blutkörperchen und dem homologen Anti-Erythrozyten-Lysin.

Durch Reduzierung der Reaktionsmengen wurde die KBR zuerst 1949 von FULTEN und DUMBEL (34), 1954 von PIKE et al. (69) und später durch Einführung des Mikrotiter-systems von TAKATSY 1955 (85), 1961 von WASSERMAN und LEVINE (88), 1962 von SEVER (80) und 1969 von LENNETTE (56) vereinfacht und ihre Wirtschaftlichkeit erhöht.

Zur Au-Ag- und Antikörper-Bestimmung wurde die KBR 1969 herangezogen (74, 82). Ab 1970 wurde sie auch für Routineuntersuchungen als eine zuverlässige und empfindliche Nachweismethode verwendet (9, 29, 45, 51, 52, 75, 77, 83, 89).

4. Aussehen und biophysikalisches Verhalten des Australia-Antigens

4.1 Morphologie und Größe

Bei der elektronenoptischen Untersuchung der Serumproben von 3 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, Mongolismus mit nicht-ikterisch-chronischer Hepatitis und chronischer Reticuloendotheliosis fanden BAYER et al. (10) zwei Arten von Partikel.

1. Runde Partikel, 19-21 nm im Durchmesser mit 3 nm großen Untereinheiten. Ein zentraler Kern wurde bei einigen dieser Partikel festgestellt. Die übrigen erschienen leer.
2. Partikel, die eine filamentöse Form zeigten und deren Durchmesser 18-21 nm und deren Länge 50-230 nm betrug.

ALMEIDA et al. (3) und BARKER et al. (7) konnten diese Befunde bei weiteren Untersuchungen bestätigen. Eine wichtige Feststellung machten DANE et al. (28) bei der Untersuchung von 16 Serumproben von Hepatitis-Patienten. Außer den oben geschilderten zwei Partikelarten fanden sie in drei der Proben außerdem einzelne größere Partikel von etwa 42 nm Durchmesser. Dies wurde von JOKELAINEN et al. (49) bestätigt, die mit dem positiven Kontrastierungsverfahren an den großen sphärischen Partikeln eine

Doppelmembran und einen zentralen Kern erkennen konnten (49).

4.2 Dichte, Molekulargewicht und Sedimentationskonstante

Eine Dichtebestimmung mittels CsCl-Gradienten-Zentrifugation durch BAYER und Mitarbeiter (10) ergab eine mittlere Dichte von $1,21 \text{ g/cm}^3$ für die 20 nm Partikel.

BARKER et al. (7) bestimmten mit der gleichen Methode die Dichte mit $1,22 - 1,27 \text{ g/cm}^3$ und GERIN et al. (35) in CsCl mit $1,20 \text{ g/cm}^3$ in Saccharose mit $1,16 \text{ g/cm}^3$.

Die Sedimentationskonstante des 20 nm Partikels wurde von den letzteren Autoren mit 100 - 110 s, von einer anderen Gruppe (36) mit 52 - 54 s und von SCHÖBER et al. (78) mit 34,1 s bestimmt. Das Molekulargewicht der 20 nm-Partikel wurde von BÖHME et al. (26) mit 860.000 angegeben.

4.3 Verhalten gegenüber physikalischen Einflüssen

Das Au-Ag ist bei niedrigen Temperaturen (-70°C bis -20°C) jahre- bis jahrzehntelang (7, 81, 91) und bei Zimmertemperatur wenigstens 6 Monate (59) lang haltbar. Erhitzen für 30 Minuten bei 56°C führte nach Feststellung von BARKER et al. (7) zu einem 50%igen Titerver-

lust im Immunodiffusionstest, der vielleicht durch das Entstehen von Aggregaten verursacht worden ist. GERIN et al. (35) fanden keinen KBR-Titerverlust beim Erhitzen der Proben auf 56°C über Nacht. MILLMAN et al. (59) beobachteten nach 60 minütigem Erhitzen bei 85°C einen vollständigen Verlust der Immunoaktivität, wohingegen nach HORST et al. (47) ein 3 stündiges Kochen im Wasserbad keinen Einfluß auf die Antigenität hatte.

4.4 Verhalten gegenüber chemischen Einflüssen

Das Au-Ag besitzt eine erhebliche pH-Stabilität. Eine Säurebehandlung bei pH 2,7 hatte keinen Einfluß auf die Antigenität (59). Nach DREESMAN et al. (31) zerstörte eine einstündige Säurebehandlung bei pH 2,4 lediglich die filamentösen und 42 nm großen Partikel, hatte aber keinen Einfluß auf die 20 nm großen Partikel. Nach einer Behandlung des Au-Ag mit Äther oder Frigen, beobachteten BARKER et al. (7) eine Verkleinerung der Partikel um durchschnittlich 4 nm.

Hieraus schlossen sie auf eine Entmantelung des Antigens durch Detergentien. SHULMAN und Mitarbeiter (81) hielten dies eher für eine Entfernung von Antikörpern, die sich an die Antigenoberfläche angelagert hatten. HORST et al. (47) behandelten das gereinigte Antigen 7 Tage lang mit 1,5%igem Formalin, 1 Std. mit unverdünntem Formalin und

24 Std. mit gechlortem Wasser (0,35 mg Cl/1), 24 Std. mit einer 2%igen Phenollösung, 3 Tage mit Chloroform und 2 Wochen mit Glycerin-HCl pH 1,8. Hierbei stellten sie keinen Antigenitätsverlust fest. Dagegen ging die Antigenität bei 5 min. Behandlung mit 1%igem Benzalkoniumchlorid verloren. Eine Behandlung mit Lipase, Neuraminidase, Ribonuklease und Desoxyribonuklease verlief ohne morphologisch sichtbare Veränderung (59).

Durch Behandlung des Antigens mit 1%igem Dodecylsulfat, 25%igem Phenol und 0,05% Thimerosal wurde die Immunoaktivität zerstört (30, 44, 51).

B. PROBLEMSTELLUNG

Das Ziel meiner Untersuchungen war die Herstellung monospezifischer Antiseren, die eine notwendige Voraussetzung für den Nachweis der Subtypen des Au-Ag bilden.

Plasma oder Serum von Personen mit Au-Antigenämie stellen derzeit die einzige Quelle für die Gewinnung des hierfür benötigten Antigens dar.

In Frage kamen für mich Blutproben von Blutspendern, Patienten mit akuter Virushepatitis und chronischkranke Antigenträger, die immunsuppressiv behandelt wurden. Der Au-Ag-Titer bei Gesunden ist gewöhnlich niedrig, der bei dem oben genannten Patientenkreis dagegen oftmals sehr hoch. Größere Mengen von hochtiterigem Patientenblut waren jedoch aus medizinischen Gründen nicht zu erhalten. Dagegen konnten Au-Ag-positive Blutkonserven von normalen Blutspendern ohne große Schwierigkeiten erworben werden.

Zur Herstellung der monospezifischen Antiseren war die Reinigung und Konzentrierung des Au-Ag aus jeder einzelnen Konserve notwendig, um Impfmateriäl für die Immunisierung der Versuchstiere zu erhalten, das jeweils nur aus einem Subtyp des Antigens bestand.

Bei der Reindarstellung des hauptsächlich aus Protein bestehenden Antigens aus dem so komplexen und konzentrierten Gemisch von Proteinen des menschlichen Plasmas ergeben sich beträchtliche Schwierigkeiten. Proteine können auf Grund

ihrer außerordentlichen Empfindlichkeit vielen Methoden der Chemie oder physikalischen Chemie nicht unterworfen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde trotz dieser Schwierigkeiten versucht, die Isolierung, Reinigung und Konzentrierung des proteinartigen Au-Ag aus dem "Proteingemisch" Plasma zu erreichen.

1. Die möglichen Verfahren zur Reindarstellung

Die Anzahl der hierfür verwendbaren Methoden ist beschränkt. Zur Auftrennung der Proteine ohne Veränderung ihrer immunologischen Struktur können ihre physikalischen Eigenschaften herangezogen werden. Als erstes bewirken Teilchengröße, Molekulargewicht und die daraus resultierende Dichte bei der Ultrazentrifugation Unterschiede in der Sedimentation. Als zweites bietet sich die Verwendung von Molekularsieben an. Weiterhin erlauben die verschiedene Löslichkeit und die unterschiedliche elektrische Ladungsdichte der Proteine eine chemische (Ausfällung beim Aussalzen oder Entsalzen) und eine physikalische (Elektrophorese) Trennung. Auf der Kombination von Elektrophorese und Molekularsiebeffekt beziehungsweise pH-Gradient beruhen Methoden wie Diskelektrophorese, Isoelektrofokussierung und Isoelektrofokussierung im Polyacrylamid-Gel, die meistens für analytische Zwecke Verwendung finden.

1.1 Ausschleudern durch Ultrazentrifugation

Hierbei wird die Zentrifugalkraft zum Ausschleudern von Makromolekülen eingesetzt. Die Sedimentation des Au-Ag aus Serum- oder Plasmaproben ist durch die Erzeugung eines Schwerfeldes von 40 000 g oder höher ohne weiteres möglich. Nachteilig ist die gleichzeitige Sedimentation von ähnlich schweren makromolekularen Eiweißpartikeln, die im Serum oder Plasma reichlich vorhanden sind. Dieses Verfahren wurde als die häufigste Methode zur partiellen Trennung des Au-Ag von verschiedenen Serumbegleitproteinen verwendet.

1.2 Trennung durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation

Eine bessere Trennung von makromolekularen Partikeln ist wegen ihrer verschiedenen Dichte mit der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation zu erreichen. Hierbei werden in einem vorgefertigten oder sich bei der Zentrifugation bildenden Dichtegradienten die Partikel in den Zonen entsprechender Dichte angereichert. Um die Trennung und Reindarstellung des Au-Ag mit Hilfe dieser Technik durchführen zu können, ist zuerst eine partielle Reinigung und Verminderung des Eiweißgehaltes im Versuchsmaterial notwendig. Der Nachteil dieser Methode liegt im relativ großen Arbeitsaufwand und der Gewinnung ziemlich kleiner Mengen von ge-

reinigtem Material. Daß sich etwa gleich dichte Partikel in einer Bande ansammeln, führt außerdem zu Schwierigkeiten.

1.3 Trennung durch Gelfiltration

Für wasserlösliche makromolekulare Proteine ist die Gelfiltration zur Trennmethode der Wahl geworden. Sie ist ein Verfahren, das auf dem Prinzip der Verteilungschromatographie beruht. Die bei dieser Methode verwendeten Gele werden aus zwei Komponenten hergestellt: Der Dispersier-Substanz (Trockengel) und dem Dispersionsmittel (Pufferlösung). Das bei der Mischung entstehende, gequollene Gelgerüst besteht aus Makromolekülen, die an Haftpunkten miteinander verbunden sind und dadurch ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Das Dispersionsmittel in den Gelpartikeln ist in Abhängigkeit vom Vernetzungsgrad des Gels für die zu trennenden Moleküle bei entsprechend kleinem Durchmesser erreichbar (Siebefeekt der verschiedenen Porengröße für verschieden große Partikel). Bei der Elution von einem Stoffgemisch können Moleküle, deren Abmessungen eine bestimmte Partikelgröße überschreiten, nicht in das Innere dieser Gelperlen eindringen und bleiben somit außerhalb derselben. Kleinere Moleküle diffundieren mehr oder weniger in die vom Gel umschlossenen Dispersionsmittelräume ein. Wird ein derartiges Gel langsam von diesem Stoffge-

misch durchströmt, wandern die kleineren Partikel, welche in das Innere des Gels penetriert sind, langsamer als große Partikel, die sich außerhalb des Gels bewegen. Folglich verlassen die größten Moleküle das Gelbett zuerst.

Die Laufgeschwindigkeit der kleineren Moleküle wird um so mehr gebremst, je leichter diese in das Gel eindringen können, wodurch eine Trennung zwischen ihnen möglich wird.

Zur Trennung des Australia-Antigens aus Plasma und Serum eignet sich diese Methode bei Verwendung von Gelarten wie Sephadex G 200 oder Sepharose 2-6 B, die entweder eine grobe Vernetzung oder eine erhebliche Porosität aufweisen.

Die Au-Ag-Trennung unter Verwendung von Sephadex G 200 wurde zuerst von ALTER et al. (4) 1966 und 1970 von MILLMAN et al. (59) verwendet. DUIMEL et al. (32) 1972 benützten Sepharose 4 B-Gel als Trennmasse für ihre Säulenchromatographie. Ein Trennungsversuch mit Sephadex G 200 und Sepharose 2 B Säulenchromatographie für diese Zwecke wurde von PORTOCALA et al. (70) beschrieben. Auch durch dieses Verfahren gelingt keine vollständige Trennung des Australia-Antigens, insbesondere von gleichgroßen Serumproteinen. Eine optimale Reinigung des Antigens von Begleitmaterial ist erst durch die Kombination der verschiedensten Methoden denkbar.

1. 4 Ausfällung durch Verminderung der Löslichkeit

Die unterschiedliche Löslichkeit der Proteine ergibt die Möglichkeit, sie durch fraktionierte Milieuänderung von einander zu trennen. Dies kann durch Erhöhung oder Erniedrigung des Wassergehaltes - je nach Eigenschaft des Proteines - erreicht werden. Das Australia-Antigen kann man auf verschiedene Weise aus Serum- oder Plasmaproben ausfällen: Entweder mit einer konzentrierten Neutralsalzlösung, z.B. Ammoniumsulfat (5, 70) oder mit organischen Lösungsmitteln wie Äthanol oder Rivanol (5, 11, 14, 46, 79). Plasma- oder Serumproteine gleicher Löslichkeit werden dabei mitausgefällt.

2. Möglichkeiten zur Prüfung des Reinheitszustandes

Nach der Durchführung von Trennversuchen ist eine Prüfung des Reinheitszustandes des gewonnenen Australia-Antigenhaltigen Materiales als Erfolgskontrolle von größter Wichtigkeit.

Hierfür ist eine Trennung zwischen annähernd gleichgroßen und gleichschweren Proteinen notwendig, wie sie bei den vorher geschilderten Testen entstehen, bei denen elektrische Mobilität und Molekularsiebeffekt verwendet werden. Proteine verhalten sich im allgemeinen in alkalischen Lösungen als Polyanionen, die sich beim Anlegen eines Gleichstromfeldes zur Anode bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit

keit eines Teilchens hängt hierbei von seiner elektrischen Ladung und dem Widerstand des umgebenden Mediums ab. Dieser Vorgang wird Elektrophorese genannt. Man kann entweder in trägerfreiem Puffer elektrophoretisch trennen oder aber man stabilisiert das Medium durch Zugabe von grobporigen Gelen bzw. Papier oder Folien. Genauere Ergebnisse werden bei Verwendung von Gelen erzielt. Hier sind zwei Methoden gleichen Prinzipes von Wichtigkeit: 1. die Zonenelektrophorese und 2. die Diskelektrophorese.

Ein sicherer Nachweis, der eine einwandfreie Identifikation erlaubt, ist bei dem derzeitigen Stand der Kenntnisse über das Au-Ag nur mit der Immunoelktrophorese möglich, die eine Kombination von Elektrophorese in stabilem Medium (physikalisches Verfahren zur Trennung eines Proteingemisches) und einer Präzipitation mit homologenen Antikörpern (ein immunchemischer Vorgang) darstellt.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material

1.1 Sammeln von Australia-Antigen-haltigem Material

Da Au-Ag bisher nur - abgesehen von einigen Zufallsbefunden in Primaten - im Blut von Personen mit Au-Antigenämie gefunden worden ist, stellten für mich menschliche Blutproben die einzige Au-Antigenquelle dar. Auf der Suche nach Au-Ag-positiven Plasma- bzw. Serumproben wurden mehrere tausend Blutproben von normalen Blutspendern untersucht.

1.1.1 Australia-Antigen-haltiges Material von gesunden Blutspendern

Nach einer Vereinbarung mit der Städt. Blutbank München untersuchte ich 3 Monate lang täglich 100 Blutproben von Blutspendern mittels EPT auf Au-Ag. Die dabei Au-Ag-positiv reagierenden Blutkonserven wurden käuflich erworben. Nach Abtrennung der Erythrozyten vom Blutplasma wurde letzteres bei -20°C zur späteren Verarbeitung eingefroren. Es konnten 15 Au-Ag-positive Proben gefunden werden, von denen 8 bei der Titerbestimmung in der KBR eine brauchbare Au-Ag-Konzentration aufwiesen (Tab. 1).

Tabelle 1: Zahl und Titer der erworbenen Plasmaproben

Lfd. Nr.	Proben-Nr.	KBR-Titer	EPT	IDT
1	76245	1: 8	positiv	negativ
2	77403	1:16	positiv	positiv
3	78805	1: 8	positiv	negativ
4	78834	1: 8	positiv	negativ
5	79419	1:16	positiv	positiv
6	79561	1: 8	positiv	negativ
7	80723	1:32	positiv	positiv
8	80752	1:16	positiv	positiv
9	82932	1: 8	positiv	negativ
10	82979	1: 8	positiv	negativ
11	2509	1:16	positiv	positiv
12	3600	1:16	positiv	positiv
13	3751	1:64	positiv	positiv
14	4660	1: 8	positiv	negativ
15	4676	1:16	positiv	positiv

1.2 Antiseren

1.2.1 Anti-Australia-Antigen-Seren

Zum Nachweis des Au-Ag wurden kommerziell erhältliche Anti-Au-Ag-Seren der Fa. Immuno (Heidelberg) (Lot. Nr. 720, 821, 300-04 und 300-06), der Fa. BIOTEST (Frankfurt) (Kontr.-Nr. 321) verwendet.

1.2.2 Anti-Human-Serum

Zum immunologischen Nachweis der menschlichen Plasmaproteine wurde kommerziell bezogenes Anti-Human-Serum vom Pferd der Fa. Behringwerke AG benützt.

2. Methoden

2.1 Methoden zum Nachweis des Australia-Antigens

2.1.1 Immunodiffusionstest nach OUCHTERLONY (IDT)

Zur Durchführung des Tests wurde 1% Agarose reinst (Serva) in einer Pufferlösung nach PRINCE (71) (0,1 M NaCl, 0,01 M Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan, 0,001 M EDTA (Äthylendiaminteressigsäure) und 0,1% Protaminsulfat) pH 7,6 mit 0,1% Natriumacid als Konservierungsmittel 15 min lang im Wasserbad gekocht und mit der heißen Agaroselösung Objektträger oder Glasplatten mit etwa 0,1 ml/cm² beschichtet. Nach dem Erstarren des Gels in der feuchten Kammer wurden Rosetten mit 6 peripheren und einem zentralen Loch (Stanzvorrichtung der Fa. LKB Immunodiffusionseinrichtung) ausgestanzt. In das Mittelloch wurde das Antiserum und in die peripheren Löcher, die zur Untersuchung bestimmten Proben eingefüllt. Bei Bedarf ging ich in umgekehrter Reihenfolge vor: außen Antiserum, innen Testserum.

2.1.2 Elektrophoretischer Präzipitationstest (EPT)

Es wurden die von PESENDORFER und Mitarbeiter (68) beschriebene Methode der "Überwanderungselektrophorese" übernommen.

Für den EPT verwendete Reagenzien:

2.1.2.1 Diäthylbarbitursäure-Acetat-Puffer, pH 8,6

Ionenstärke = 0,1 nach Michaelis:

49,0 g Barbitat-Natrium

32,35 g Natrium-Acetat · 3 H₂O

180 ml 0,1 n HCl

ad 5000 ml H₂O

2.1.2.2 Agarlösung:

0,9 g Agarose (Fa. Serva)

25,0 ml Diäthylbarbitursäure-Acetat-Puffer

75,0 ml Aqua bidest

0,1% Natriumazid (zur Verhinderung von Bakterienwachstum)

Das Agarose-Puffergemisch wurde wie das Material für den IDT-Test behandelt. Nach dem Erstarren des Agars stanzte ich eine Doppelreihe von Löchern (ca. 4 mm Durchmesser) aus. Der Abstand zwischen zwei Löchern einer Reihe betrug 3 mm und der in Stromrichtung 6 mm von Rand zu Rand. Nach dem Stanzen der Löcher wurden sie mit den Untersuchungsproben und Antiserum gefüllt. Für den Test wurde

das Kathodisch gelegene Loch mit Antigen-haltigem Material und das anodisch gelegene mit Antiserum beschickt. Danach wurde die Platte in eine mit dem Diäthylbarbitursäure-Acetat-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und je nach Gelplattengröße mit 100 bzw. 200 V und 15-80 mA 30-60 min elektrophoriert.

2.1.3 Komplementbindungs-Reaktion (KBR)

Als Bestimmungsmethode für die Antigentiterhöhe wurde die Komplementbindungs-Reaktion im Mikrotitersystem mit der üblichen Volumeneinheit von 0,025 ml und Kältebindung über Nacht verwendet. Die für den Versuch benutzte Komplementmenge lag zwischen 2 und 3 Einheiten. Um die optimale Antikörperkonzentration des Testserums festzustellen, wurde dieses mit einem Kontroll-Antigen in einer Blocktitration (Schachbrettverfahren) bei gleichzeitiger Feststellung des Komplementverbrauches in verschiedenen Verdünnungen untersucht. Zum Hauptversuch wurden 4 Antikörpereinheiten verwendet.

Als Indikator für diese Mikro-KBR benutzte ich 1%ige mit käuflichem Ambozeptor sensibilisierte Hammelerythrozyten.

2.2 Methoden zur Reinigung und Konzentrierung von Australia-Antigen aus Plasma und Serum

2.2.1 Fraktionierte Ausfällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung

Den im Eiswasserbad gehaltenen Proben wurde unter ständigem Rühren aus einer Bürette tropfenweise gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt. Nach Erreichen einer Sättigung von 25%, 33%, 40%, 50%, 65% und 80% wurde diese Zugabe unterbrochen, der Rührvorgang noch 2 Std. fortgeführt und dann das Gemisch für 20 min bei 5000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Den Überstand dekanthierte ich und nahm das Sediment für die weiteren Untersuchungen in 0,15 M Phosphatpuffer pH 7,4 auf.

2.2.2 Frigenbehandlung stark lipämischer Proben

Zur Beseitigung der stark lipämischen Trübung mancher Plasmaproben, die bei der Gelchromatographie zur Verstopfung der Säule führen, wurde folgende Behandlung mit Frigen 113 (1,1,2-Trichlortrifluoroethan, Fa. Merck) vorgenommen: Die Probe wurde zuerst 1:2 mit 0,15 M Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt und bis zu 25% ihres Volumens mit Frigen 113 versetzt, darauf 60 sec. mit dem Ultraturrax gemischt und zur Sedimentation des

eventuell gebildeten Aerosols 30 min bei -20°C unterkühlt.

Anschließend zentrifugierte ich 30 min bei 5000 g und $+4^{\circ}\text{C}$. Der Überstand wurde zur Weiterverwendung abgezogen und das Sediment verworfen.

2.2.3. Gelfiltration mit Sephadex G 200 und Sepharose 4 B

2.2.3.1 Apparative Anordnung (Schematische Darstellung s. Abb. 1)

Folgende Geräte kamen zur Verwendung:

K 25/100 M Chromatographiesäule mit Temperiermantel (Fa. Pharmacia)

LKB-Re Cy Chrom Trennsäule, 1050 mm lang und 32 mm im Durchmesser

LKB-Perpex-Pumpe

LKB-UV-Durchflußphotometer Unicord II mit Schreiber

LKB-Fraktionensammler Ultro Rac

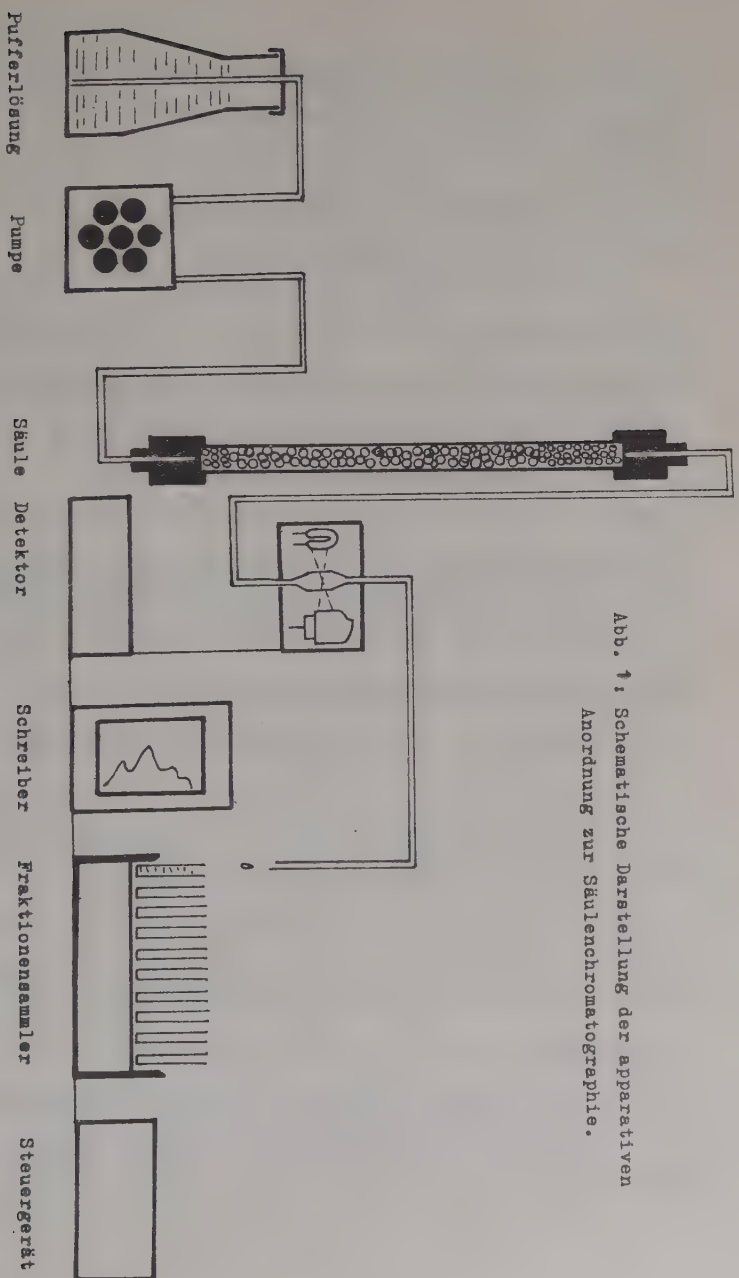
Colora-Kühlgerät für LKB Fraktionensammler Ultro Rac

2.2.3.2 Reagenzien:

a) Elutions-Puffer

Als Elutions-Puffer wurde Phosphatpuffer mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Abb. 1: Schematische Darstellung der apparativen Anordnung zur Säulenchromatographie.



NaCl	36,92 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	14,50 g
KH ₂ PO ₄	1,31 g
NaN ₃	5,00 g
H ₂ O	ad 5000 ml

b) Trennmasse

Als Trennmasse für die Säulenchromatographie wurde erstens Sephadex G 200 und zweitens Sepharose 4 B der Fa. Pharmacia (Upsala, Schweden) verwendet.

2.2.3.3 Aufstellung und Bepackung einer Re-Cy-Chrom-Säule mit Sephadex G 200 Gel.

35 g Sephadex G 200 Pulver wurden in einem 2 Liter Erlenmeyer-Kolben unter ständigem Rühren mit Aqua dest. versetzt und bis zur vollständigen Quellung des Gels unter mehrmaligem Wechsel des Wassers 48 Stunden bei + 4°C stehen gelassen. Danach wurde das überstehende Wasser abgesaugt und ein Phosphatpuffer mit einem pH von 7,4 zugesetzt. Der Puffer wurde mehrmals gewechselt und dabei das absedimentierte Gel durch Rühren aufgewirbelt.

Darauf wurden zur Entlüftung das Gel-Puffer-Gemisch mit 1000 ml Puffer mittels Wasserstrahlpumpe so lang evakuiert, bis keine Luftblasen mehr aufstiegen. Mittler-

weile wurde die Re-Cy-Chrom-Säule in einen Laborständer senkrecht eingespannt, ihr unteres Ende mit Stempel und Auslauf verschlossen, mit entlüftetem Puffer gefüllt und anschließend der Adapter und Trichter aufgesetzt. Das Gel-Puffer-Gemisch wurde durch den Trichter eingefüllt. Nachdem sich das Gel abgesetzt hatte und nicht mehr weiter absank, wurde der untere Auslauf geöffnet und der Abflußschlauch 25 cm unterhalb der Gel-Oberfläche befestigt. Der entstehende Pufferabfluß wurde bis zur Stabilisierung des Gel-Zylinders fortgeführt. Dann verschloß ich die Säule von oben und stellte die zum Durchfluß des entlüfteten Puffers notwendige untere Schlauchverbindung zur Pumpe und die obere Schlauchverbindung zum UV-Absorptiometer her. Zur Prüfung der Füllungshomogenität wurde ein Testlauf mit Dextran blau 2000 durchgeführt (Abb. 2).

2.2.3.4 Aufstellung und Bepackung einer K 25/100

Chromatographie-Säule mit Sepharose 4 B-Gel.

Sepharose 4 B-Gel wird bereits in gequollenem Zustand geliefert, wodurch die Gelherstellung entfällt. 500 ccm der Sepharose wurden innerhalb von 36 Std. mehrmals mit Puffer gewaschen und anschließend entlüftet. Die Füllung und Inbetriebnahme der Chromatographiesäule wurde auf die selbe Weise wie mit Sephadex G 200 Gel durch-

geführt. Ebenso wurde auch hierbei die Füllungshomogenität durch einen Testlauf mit Dextran blau 2000 geprüft (Abb. 3).

2.2.3.5 Auftragen und Trennung der Proben

Die Proben wurden vor dem Einpumpen 1:2 mit Elutionspuffer verdünnt und 15 min bei 5000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Dann pumpte ich zuerst 20 ml der verdünnten und geklärten Probe und anschließend Puffer von unten durch das Gelbett, chromatographierte also aufsteigend. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 26 ml/h (0,43 ml/min). Die Extinktionsmessung mit dem UV-Durchflußphotometer mit automatischer Aufzeichnung der Trennungskurven wurde bei 280 nm durchgeführt. Die am Systemende ausfließenden Tropfen wurden automatisch gesammelt und ergaben alle 30 min eine Fraktion.

2.2.4 Konzentrierung der Fraktionen

Zur Wiederherstellung des ursprünglichen Volumens oder zur weiteren Konzentration der Proben wurden diejenigen Fraktionen, die eine UV-Absorption zeigten, auf verschiedene Weise konzentriert.

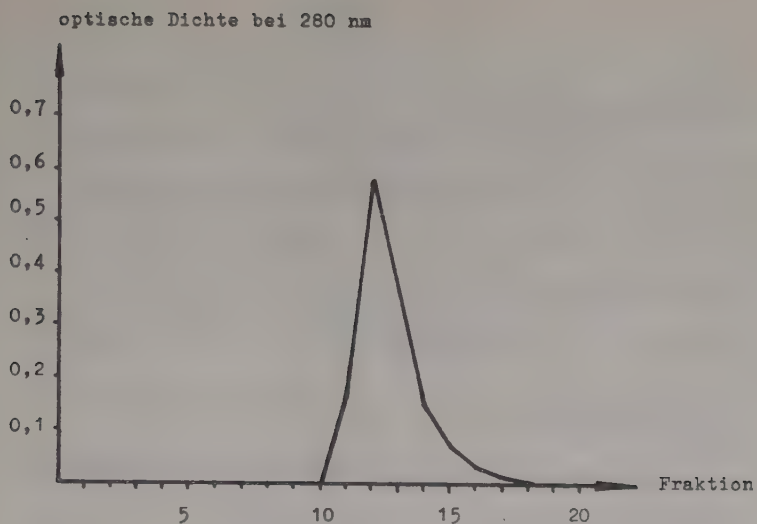


Abb. 2: Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Trennungskurve von 5 ml Dextranblau (4 mg/ml) bei Sephadex G 200.

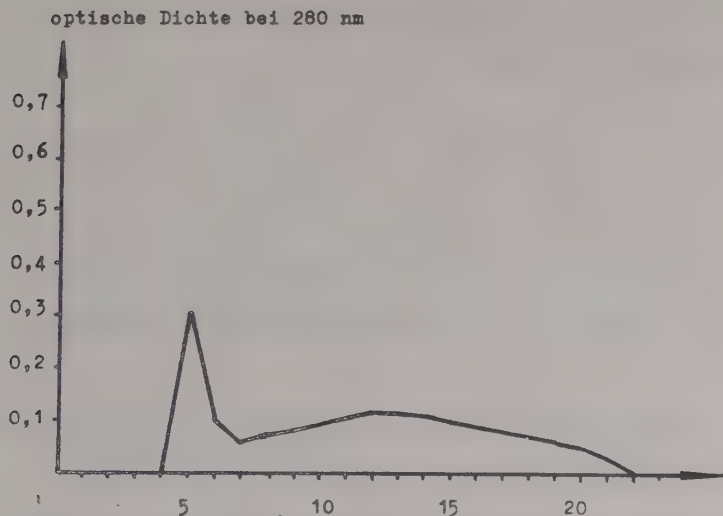


Abb. 3: Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Trennungskurve von 5 ml Dextranblau (4 mg/ml) bei Sepharose 4 B.

a) Ammoniumsulfatfällung

Im Prinzip ging ich wie unter Nr. 2.2.1 vor, jedoch wurden die Unterbrechungen nur bei 25%, 50% und 80%-igen Ammoniumsulfatsättigung durchgeführt, die drei Fällungsprodukte vereinigt und gemeinsam gegen 0,15 M Phosphatpuffer 48 Std. dialysiert.

b) Lyophilisierung

Zur Verminderung der Salzkonzentration wurden die Proben 16 Std. gegen Aqua bi-dist. dialysiert und anschließend in Lyophilisationskolben abgefüllt. Die Lyophilisierung wurde mit einem Apparat der Fa. Christ (Osterode) durchgeführt.

c) Ultrazentrifugation

Als weitere Konzentrierungsmöglichkeit stand eine Ultrazentrifuge (Modell Omega II der Fa. Christ, Osterode) mit entsprechendem Rotor (Festwinkelrotor Nr. 9720) zur Verfügung. Die Proben wurden in ihr 180 min bei 36.000 Upm (110000 g) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment in Phosphatpuffer aufgenommen.

d) Konzentrierung durch Polyäthylenglycol 20.000 (Serva)

Die stark wasseranziehende Kraft des hochpolymeren Polyäthylenglycols (MG 20 000) wurde hierbei zur Kon-

zentrierung ausgenützt. Die Proben wurden in Dialysierschläuche (Fa. Kalle, Wiesbaden) abgefüllt und bis zur gewünschten Volumenreduzierung im Polyäthylenglycol belassen.

2.2.5 Dichtegradienten-Zentrifugation

2.2.5.1 CsCl-Gradienten

Aus einem Teil einer gesättigten CsCl-Lösung (CsCl suprafein, Fa. Merck, Darmstadt) und 4 Teilen Versuchsmaterial wurden Mischungen hergestellt und in Zellulosenitrat-Zentrifugationsröhrchen (5 ml Inhalt) abgefüllt. Zur Verhinderung der Lösungsmittelverdunstung überschichtete ich die Röhrchen mit 0,25 ml flüssiges Paraffin.

2.2.5.2 Zentrifugation

Die Gradientenzentrifugationen wurden 24 Std. bei 150000 g mit der in Abschnitt 2.2.3.6.c angegebenen Zentrifuge und dem Schwenkbecherrotor Nr. 9750 durchgeführt.

2.2.5.3 Fraktionierung

Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Röhrchen fixiert, am unteren Pol punktiert und von oben mit

einer selbstkonstruierten Spritze (Kolbenvortrieb mit Hilfe einer Mutter und Spindel) (Abb. 4) flüssiges Paraffin in die verschlossenen Röhrchen gepreßt. Der Inhalt der Röhrchen wurde in 20 Fraktionen, je 0,25 ml abgetropft.

2.2.5.4 Bestimmung der Dichte

Zuerst wurde mit einem ABBE-Refraktometer (Fa. Carl ZEISS) der Brechungsindex der Fraktionen festgestellt, aus dem mit Hilfe einer Eichkurve die Dichte der Fraktionen bestimmt werden konnte.

2.3 Prüfung des Reinheitszustandes mittels Immunoelktrophorese

Zur Feststellung des Reinheitszustandes des gewonnenen Materiales wandte ich ausschließlich diese Methode an. Dazu verwendete ich die gleichen Agargelplatten und Puffer, wie sie für den elektrophoretischen Präzipitations-test (2.1.2) hergestellt wurden. Auf jeder Gel-Platte wurden mit einer Stanze mehrere Kanäle (40 x 1 mm) und Löcher (1,5 mm im Durchmesser) nebeneinander ausgestochen. Das Gel aus den vorgestanzten Löchern wurde mit einer Pasteur-Pipette, die an einer Wasserstrahlpumpe

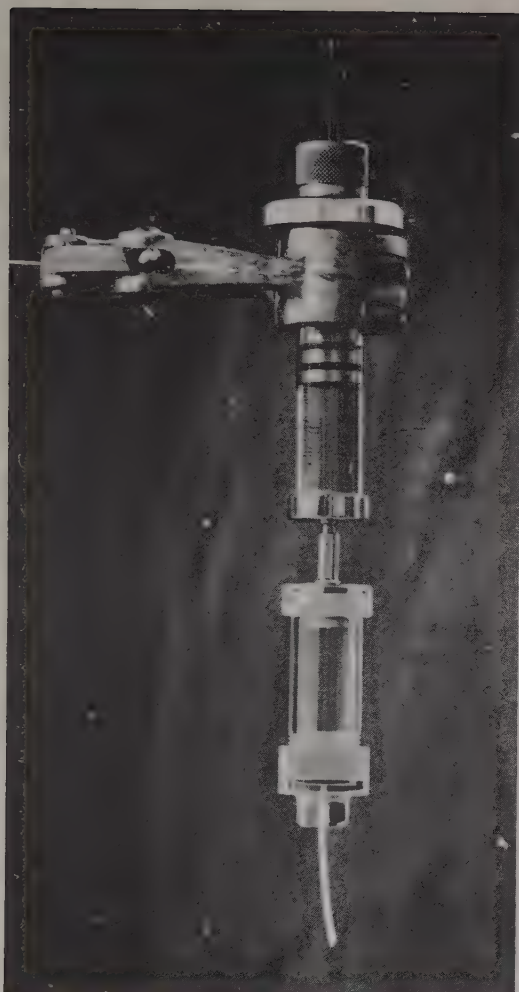


Abb. 4: Fraktionierspritze (Kolbenvortrieb mit Hilfe einer Mutter und Spindel) und dazu passende Röhrchenhalter.

angeschlossen war, entfernt. Die Löcher wurden mittels Glaskapillaren mit dem gereinigten Material bis zum Rand gefüllt, darauf die Platte in die Elektrophoresekammer gegeben, die Gel-Puffer-Verbindung durch Filterpapier hergestellt und 60 min elektrophoriert. Anschließend wurde das Gel aus den Kanälen entfernt und diese mit Anti-Human-Serum gefüllt. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte erstmals nach 24-stündiger Inkubationszeit.

2.4 Versuch der Herstellung von monospezifischen Anti-Australia-Antigen-Seren

Junge, gesunde Meerschweinchen von 400 - 500 g Körpergewicht wurden mit nummerierten Ohrmarken versehen und nach 14-tägiger Gewöhnung an den Käfigaufenthalt paarweise auf zweierlei Weise immunisiert:

2.4.1 Verwendung von Freund'schen Adjuvans und Versuch, eine Immun-Toleranz zu erreichen

Diese Methode ist erstmals von HENNEY und ISHIZAKA (43) für die Herstellung von Immunoglobulin-klassenspezifischen Antiseren beschrieben worden. MADALINSKI et al. (57) verwendeten dieses Verfahren zur Herstellung von Au-Ag-spezifischen Antiseren.

Hierzu erhielt jedes Meerschweinchen zuerst 0,5 ml sterile Australia-Antigen-negative humane Euglobulin-Fraktion intracardial injiziert. Sofort anschließend wurde jedem Tier 1 ml des 1:2 mit komplettem Freund'schem Adjuvans vermischten Impfmateri als intraperitoneal verabreicht. Nach 7 Wochen erhielten alle Tiere eine Boosterinjektion von 0,5 ml Impfmateri al ohne Adjuvans subkutan. Eine Woche später wurden sie entblutet.

2.4.2 Normale Immunisierung ohne Verwendung von Adjuvans und ohne Injektionen zur Erzielung einer Immun-Toleranz

Die Meerschweinchen wurden in zweiwöchigem Abstand dreimal mit je 2 ml Impfmateri al intraperitoneal und zweimal mit 0,25 ml intramuskulär in die Hinterläufe immunisiert. 2 Wochen nach der letzten Injektion erhielten sie eine Auffrischinjektion von 1 ml subkutan und wurden eine Woche später entblutet.

2.5 Dokumentation der Präzipitationen im Agar

2.5.1 Photographie der Nativpräparate in Flüssigkeit

Zum Photographieren von Immunpräzipitaten im Agargel beleuchtete HUNTER 1959 (48) die Präparatplatten von

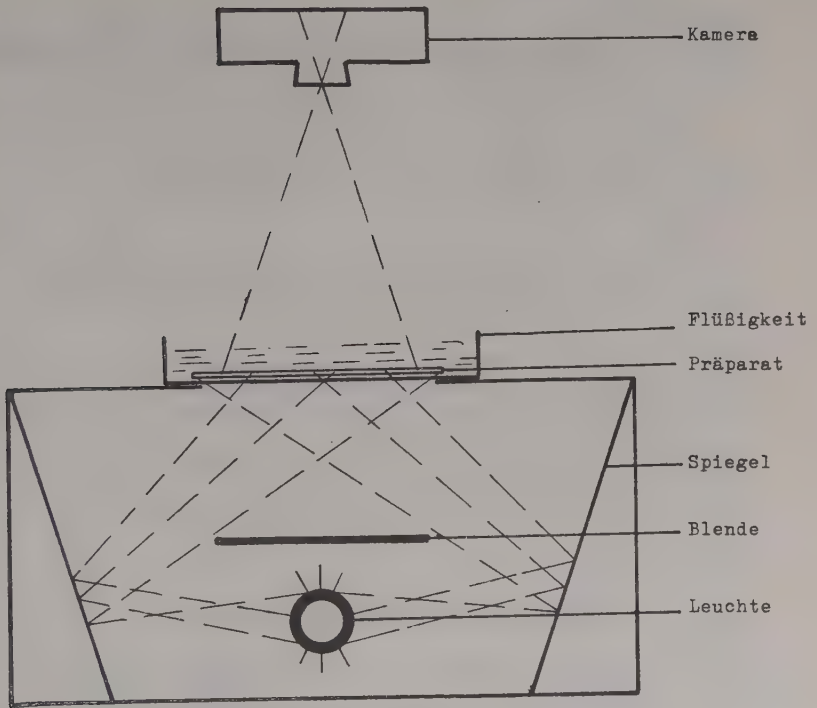
unten und seitlich mit zwei Scheinwerfern mit "gebündeltem" Licht. Diese Idee wurde von mir übernommen und ein Beobachtungsapparat konstruiert (Abb. 5), in dem das Licht schräg auf die Präparate fällt, wodurch die Präzipitationslinien im Agar sehr deutlich sichtbar werden. Dies ermöglicht ein sichereres Ablesen und eine bessere photographische Darstellung.

Zur Verhinderung störender Reflexe wurden die Präparate in einer mit Pufferlösung oder Wasser gefüllten durchsichtigen Schale auf das Beobachtungsgerät gestellt. Die Photographie erfolgte von oben. Als Belichtungszeit wurde je nach Stärke der Präzipitationslinien 1 - 4 sec bei einer Blende von 8 oder 11 gewählt.

2.5.2 Haltbarmachung

Zur Haltbarmachung für eine längere Aufbewahrung wurden die Präparate 2 Tage in Phosphatpuffer ausgewaschen, um sie von Restproteinen zu befreien. Anschließend wurden sie mit feuchtem Filterpapier bedeckt und im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Zum Färben der Präzipitationslinien wässerte ich die Präparate zuerst 5 min in Aqua dest. und legte sie dann für 15 min in ein Gefäß mit 10%iger Amidoschwarzlösung in Methanol-Eisessig (9 + 1). Darauf wurden sie 30 min lang mit Methanol-Eisessig (9 + 1) entfärbt und luftgetrocknet. Auf die-

Abb. 5: Schematische Darstellung des Beobachtungsapparates
und der Negativ-Photographie unter Wasser.



se Weise hergestellte Präparate ließen sich auch als Negative für photographische Abzüge verwenden.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Anreicherung des Australia-Antigens durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Diese Versuche wurden mit den Au-Ag-positiven Plasmaproben Nr. 3751 und Nr. 4676 durchgeführt.

3.1.1 Fällungsprozedur und Wiederherstellung des physiologischen Zustandes

Jeweils 20 ml beider Proben wurden wie in 2.2.1 beschriebenen fraktioniert gefällt.

Die Sedimente nahm ich in 2 ml Phosphatpuffer auf und dialysierte sie gegen größere Mengen von Phosphatpuffer.

3.1.2 Nachweis des Australia-Antigens

Er wurde qualitativ mittels des Immunodiffusionstestes (IDT) und des elektrophoretischen Präzipitationstestes (EPT), quantitativ mittels der Komplementbindungsreaktion (KBR) durchgeführt. Entgegen allen Erwartungen wurde das Antigen zwar in unterschiedlicher Menge, aber in sämtlichen Fraktionen festgestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2 Die fraktionierte Ausfällung zweier Australia-Antigen-positiver Plasmaproben mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Vorkommen des Antigens in den verschiedenen Fraktionen.

Fraktion	(NH ₄) ₂ SO ₄ -Konz.		Probe Nr. 3751			Probe Nr. 4676		
	Sättigung %	Mol/L	EPT	IDT	KBR	EPT	IDT	KBR
1	25	1,025	++++	++	1:16	++	+	1: 8
2	33	1,35	++++	++	1:16	+++	++	1: 8
3	40	1,64	++++	++++	1:64	+++	+++	1:16
4	50	2,05	++++	+++	1:32	++++	++	1:32
5	65	2,665	++++	++++	1:16	+++	+++	1:16
6	80	3,28	++++	++++	1:128	++++	++++	1:32

3.2 Versuche das Au-Ag durch Säulenchromatographie abzutrennen und zu konzentrieren

3.2.1 Trennung durch Sephadex G 200

Folgende Proben wurden nacheinander durch die Sephadex G 200 Chromatographie-Säule gepumpt:

10 x 10 ml Plasma Nr. 2509

7 x 10 ml Plasma Nr. 3600

10 x 10 ml Plasma Nr. 3751

8 x 10 ml Plasma Nr. 4676

7 x 10 ml Plasma Nr. 80752

Bei der Registrierung der optischen Dichte der aus der Säule fließenden Eluate wurden 8 Std. nach Chromatographiebeginn Trennkurven über den Fraktionierungsverlauf der Proben erkennbar (Beispiele siehe Abb. 6-10). In diesen Kurven sind 5 nacheinander folgende Peaks feststellbar, die in allen Versuchen in identischer Weise auftraten. Unterschiede waren nur in der optischen Dichte (entsprechend des Proteingehaltes) der Peaks der 5 verschiedenen Plasmaproben zu erkennen.

Abb. 6: Sephadex 200, Gel-chromatographische Trennung von 20 ml Plasmaprobe 2509

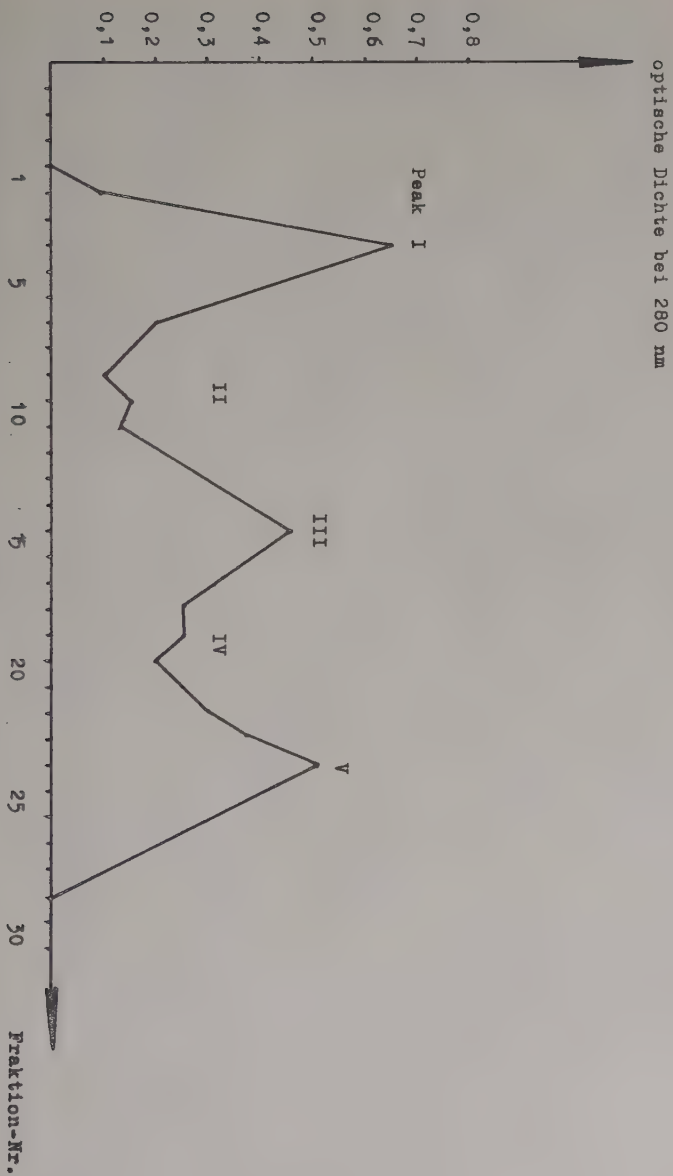


Abb. 7: Sephadex G 200, Gel-chromatographische Trennung von 20 ml Plasmaprobe 3600

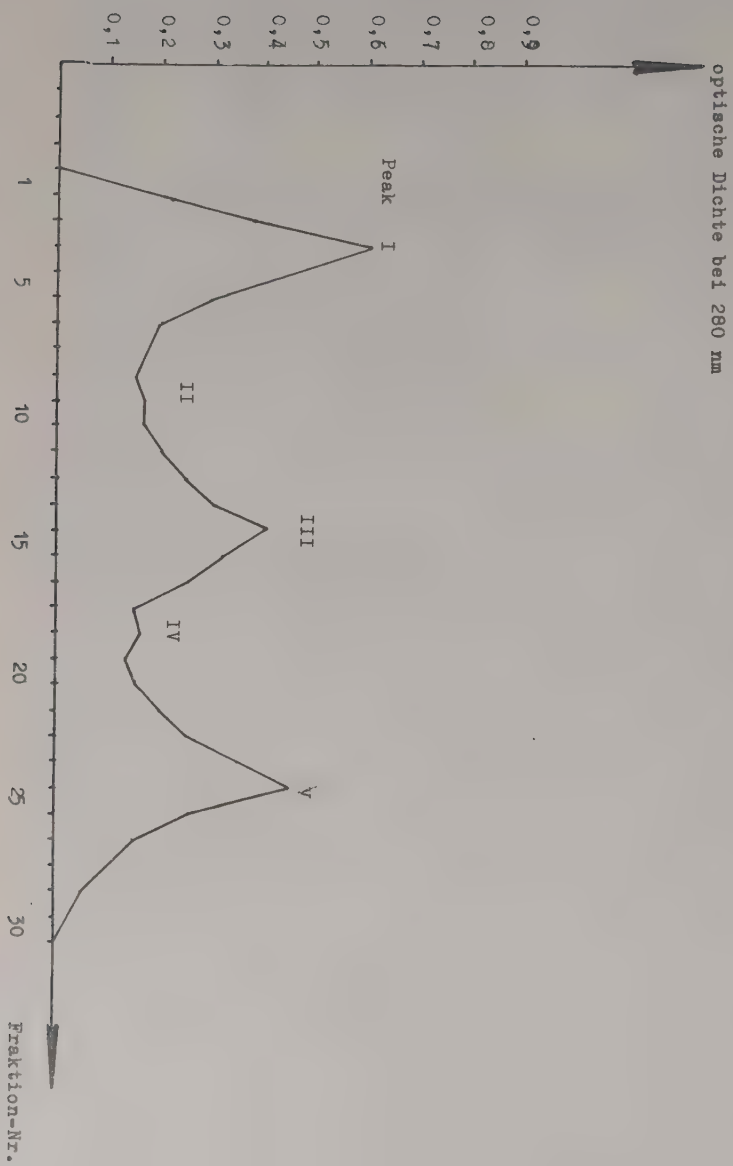


Abb. 8: Sephadex G 200, Gel-chromatographische Trennung von 20 ml Plasma Probe 3751

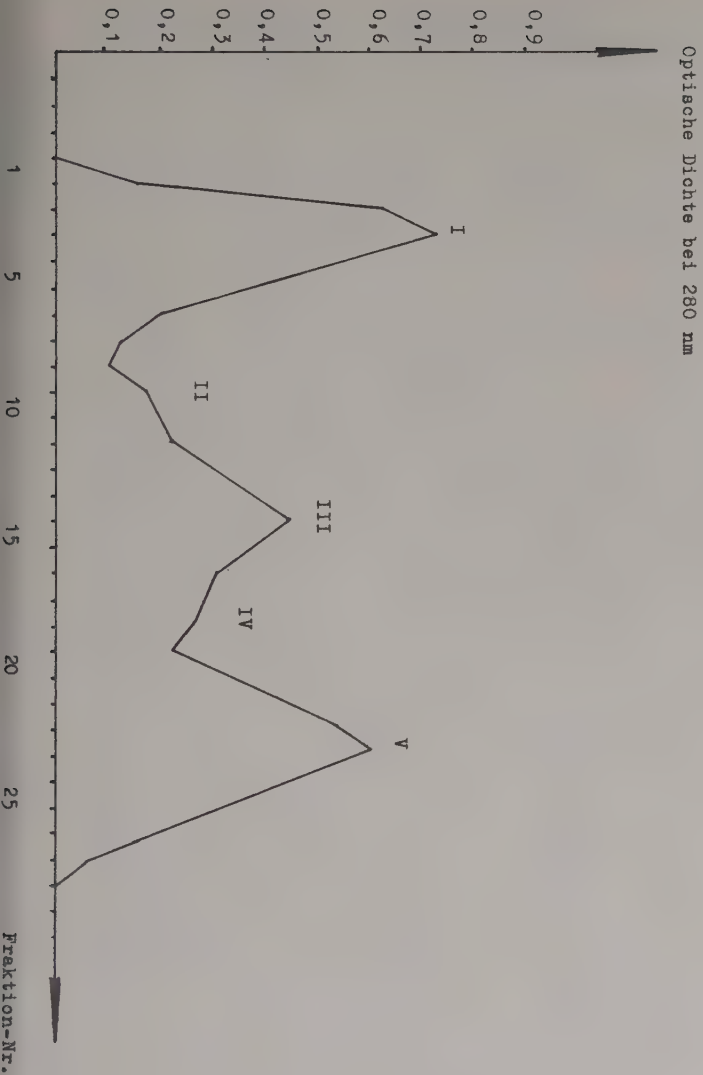


Abb. 9: Sephadex G 200, Gel-chromatographische Trennung von 20 ml Plasma Probe 4676

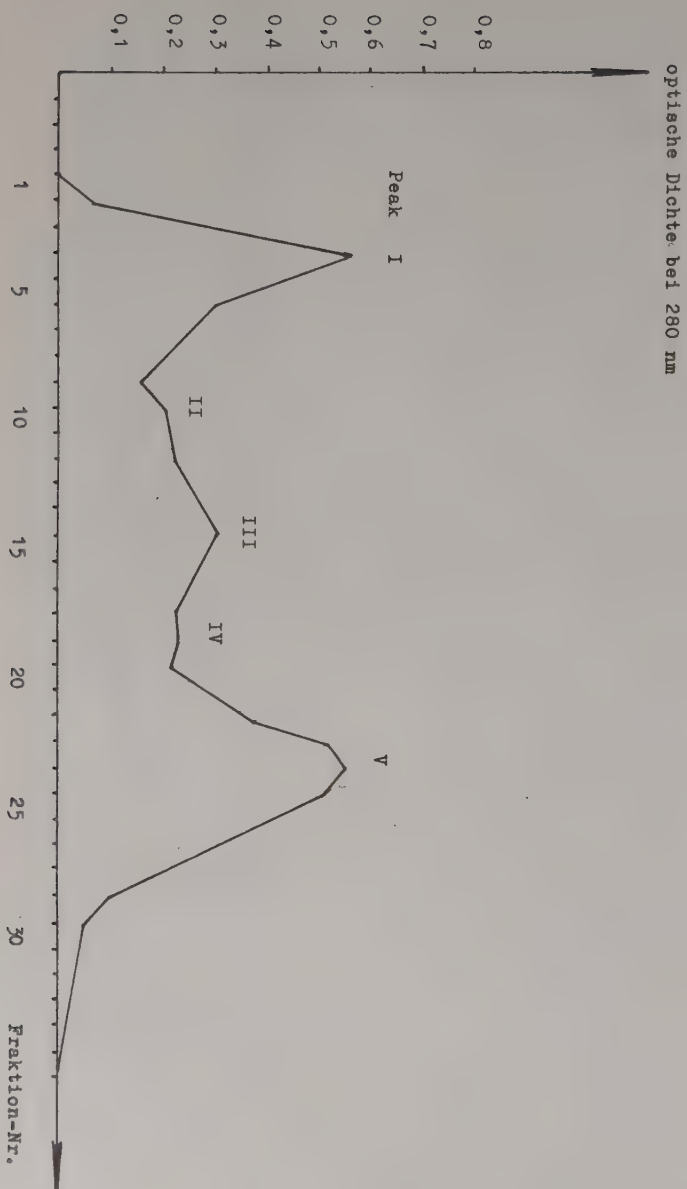
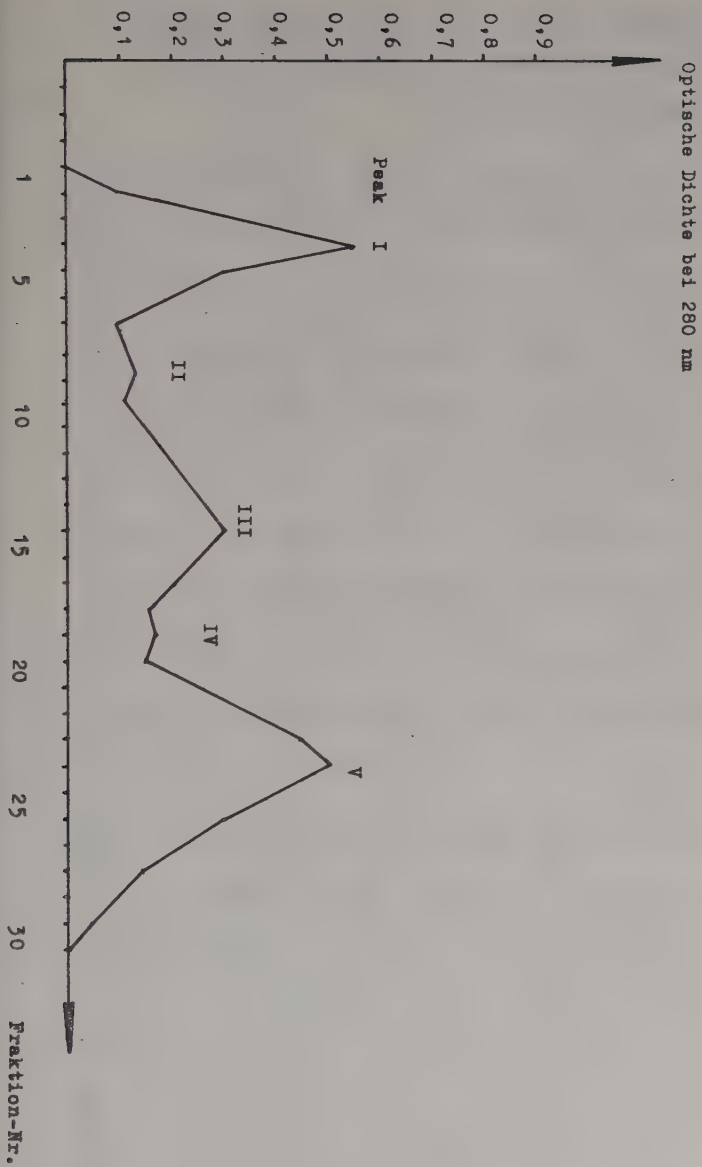


Abb. 10: Sephadex G 200, Gel-chromatographische Trennung von 20 ml Plasmaprobe 80752



3.2.1.1 Feststellung des Antigenvorkommens in den verschiedenen Fraktionen nach unterschiedlichen Konzentrierungsmethoden

Zu diesem Zweck wurden jeweils vier der chromatographisch getrennten Plasmaproben Nr. 3751 und 4676 verwendet. Die Fraktionen jeder der vier identischen Proben wurden mit vier verschiedenen Methoden konzentriert. Durch Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung, Lyophilisation, Ultrazentrifugation und Dialysierung gegen Polyäthylenglycol 20000 (Methoden siehe 2.2.1). In den durch Aussalzung und Lyophilisation konzentrierten Proben wurde das Au-Ag ausschließlich in den Fraktionen 2 - 6 gefunden, in den durch Ultrazentrifugation bzw. Polyäthylenglycol konzentrierten Proben außerdem auch in den Fraktionen 1 und 7 (Tabellen 3 und 4).

Bei der Darstellung dieser Ergebnisse in Kurvenform (Abb. 11 und 12) ist deutlich zu erkennen, daß das Au-Ag die Sephadex-Säule als erstes verläßt. Bei Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Konzentrierungsverfahren kann man feststellen, daß die optimalsten Methoden die Ultrazentrifugation und die Dialysierung gegen Polyäthylenglycol 20 000 darstellen.

optische Dichte bei 280 nm

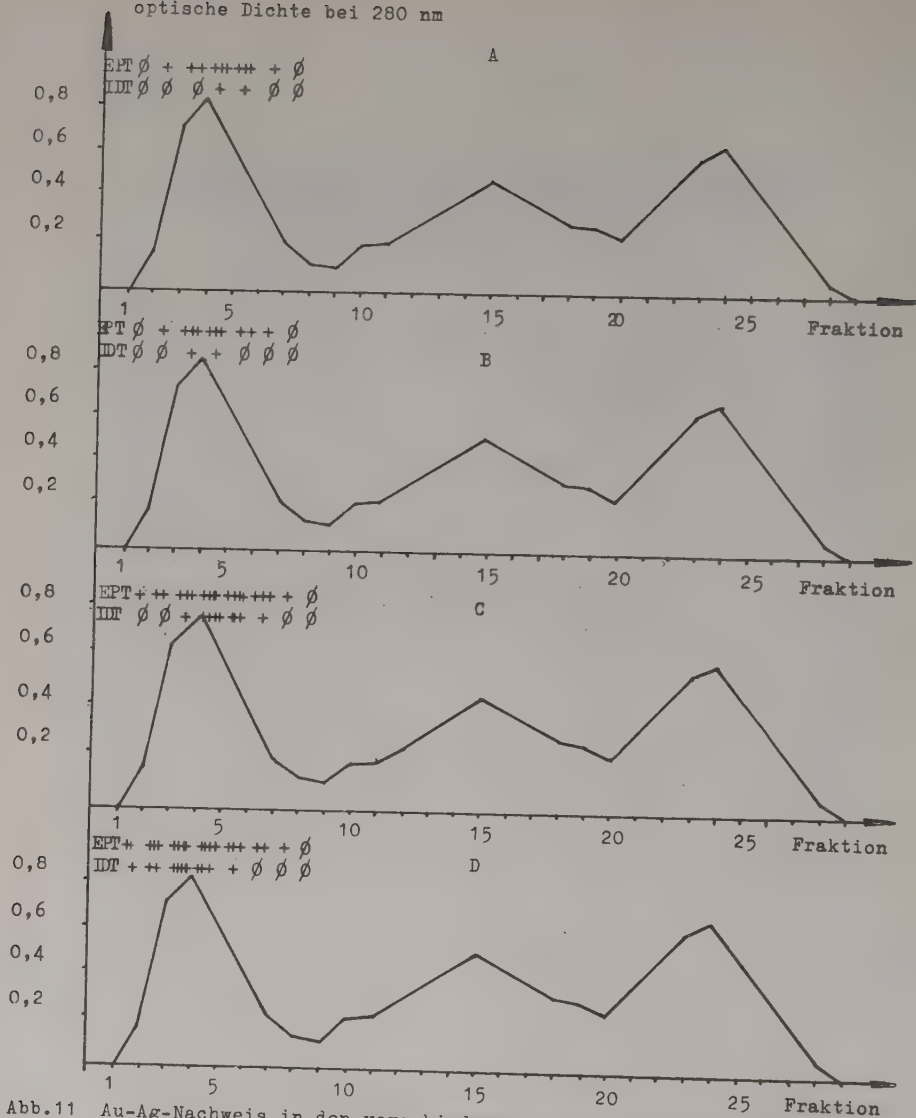


Abb.11 Au-Ag-Nachweis in den verschiedenen Fraktionen der Sephadex G 200 chromatographisch getrennten Probe 3751 :

Fractionen konzentriert durch:

A. Ammoniumsulfatfällung

B. Lyophilisation

C. Zentrifugation

D. Polyäthylenglycol 20 000

Tabelle 4: Ergebnisse des Australia-Antigen-Nachweises in den Fraktionen der 4 Proben Nr. 4676, die durch Sephadex G 200 getrennt und mit 4 verschiedenen Methoden konzentriert wurden

Fraktion	Probe 1 (Amm.-Sulfat)		Probe 2 (Lyophilis.)		Probe 3 (Ultrazentrif.)		Probe 4 (Polyäthylenglycol)	
	EPT	IDT	EPT	IDT	EPT	IDT	EPT	IDT
1	Ø	Ø	Ø	Ø	+	Ø	+	Ø
2	+	Ø	+	Ø	+	Ø	++	Ø
3	+ / ++	Ø	+	Ø	+++	+	+++	+
4	++	Ø	++	Ø	++++	+++	++++	+++
5	++	Ø	+ / ++	Ø	++++	+++	++++	+++
6	+	Ø	+	Ø	+++	+	++	Ø
7	Ø	Ø	Ø	Ø	++	+	+	Ø
8-35	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

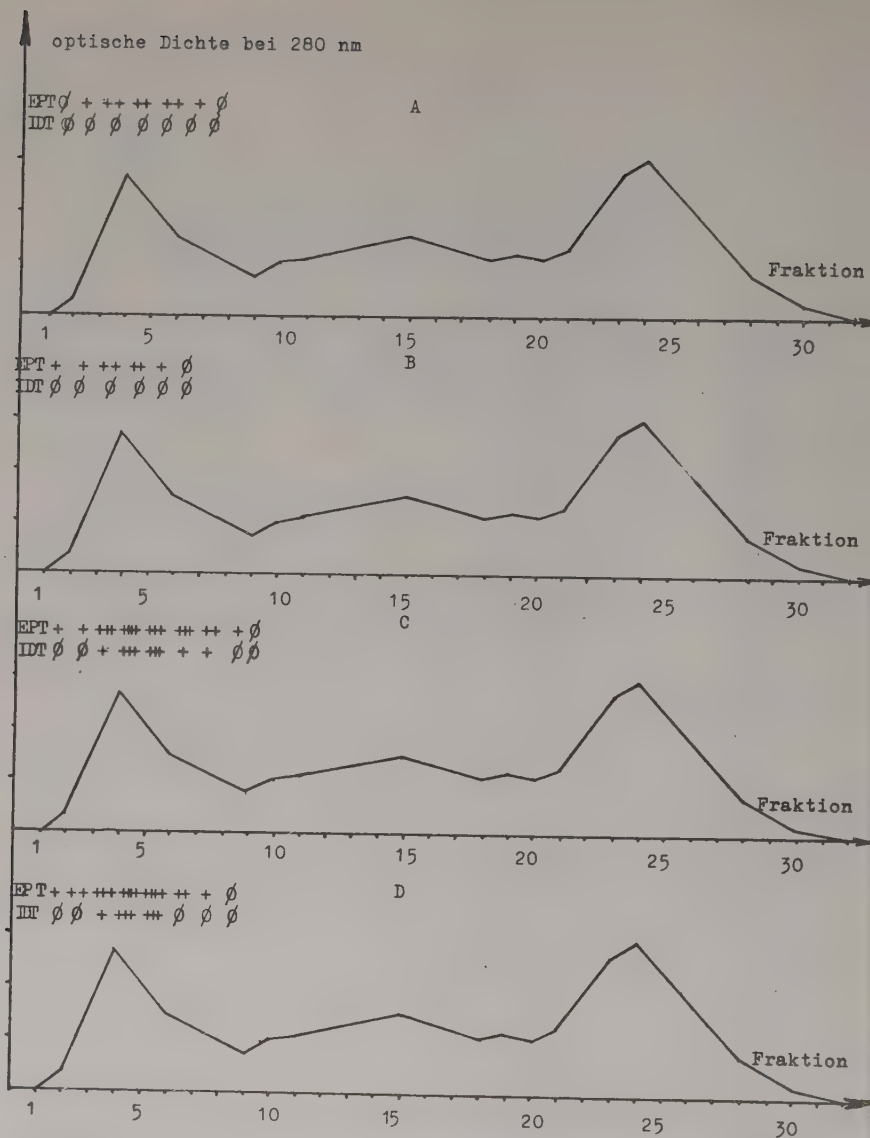


Abb.12 Au-Ag-Nachweis in den verschiedenen Fraktionen der Sephadex G 200 chromatographisch getrennten Probe 4676:

Fraktionen konzentriert durch:

- A. Ammoniumsulfatfällung
- B. Lyophilisation
- C. Zentrifugation
- D. Polyäthylenglycol 20 000

3.2.1.2 Versuche der Reindarstellung des Au-Ag durch Ausfällung der Begleitproteine

Nach der Feststellung, daß das Au-Ag in den Fraktionen des ersten Peaks einer Sephadex G 200 säulenchromatographisch getrennten Probe zu finden ist und in diesen Fraktionen reichlich Makroglobuline (unlöslich in salzfreiem Wasser) vorhanden sind, wurden die Fraktionen des Peaks eins der übrigen Proben von Nr. 3.2.1 zur Ausfällung der Begleitproteine (Globuline) 48 Std. bei 4°C gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Anschließend folgte die Entfernung des Fällungsprodukts durch Zentrifugation.

Die Konzentrierung der auf diese Weise gereinigten Proben erfolgte durch Ultrazentrifugation und Polyäthylenglycol 20000 nach den in 2.2.4. d beschriebenen Methoden.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 und 6 dargestellt. Bei dem quantitativen Nachweis des Au-Ag mit der KBR ist eine Konzentrierung der Proben um das 2- bis 4-fache erreicht worden.

Tabelle 5: Vergleichende Ergebnisse der nicht gereinigten und gereinigten bzw. konzentrierten Australia-Antigen-positiven Plasmaproben 3600, 3751, 4676 und 80752

Teste	Plasmaprobe 3600	Plasmaprobe 3751	Plasmaprobe 4676	Plasmaprobe 80752
	nicht gerei- nigt Peak 1 Pool Uz konz.	Sephad. G 200 Peak 1 Pool UZ konz.	nicht gerei- nigt Peak 1 Pool UZ konz.	Sephad. G 200 Peak 1 Pool UZ konz.
KBR-T.	1:16	1:8	1:64	1:64
EPT	++++	++++	++++	++++
IDT	++	0	++++	++++

Tabelle 6: Vergleichende Ergebnisse der nicht gereinigten und gereinigten bzw.

konzentrierten Australia-Antigen-positiven Plasmaproben 2509, 3600 und 80752

Teste	Plasmaprobe 2509				Plasmaprobe 3600				Plasmaprobe 80752			
	Roh- antigen	Sephadex G 200 Peak 1 Pool	Sephadex G 200 Peak 1 Pool Dial. Konz. Polyä.	Roh- antigen	Sephadex G 200 Peak 1 Pool	Sephadex G 200 Peak 1 Pool Dial. Konz. Polyä.	Roh- antigen	Sephadex G 200 Peak 1 Pool	Roh- antigen	Sephadex G 200 Peak 1 Pool	Sephadex G 200 Peak 1 Pool Dial. Konz. Polyä.	Sephadex G 200 Peak 1 Pool Dial. Konz. Polyä.
KBR Titer	1:16	1:4	1:32	1:16	1:8	1:64	1:16	1:4	1:16	1:4	1:32	1:32
EPT	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++	++++	++++
IDT	++	Ø	+++	+++	++	++++	+	Ø	+	Ø	++	++

3.2.1.3 Dichtegradientenzentrifugation

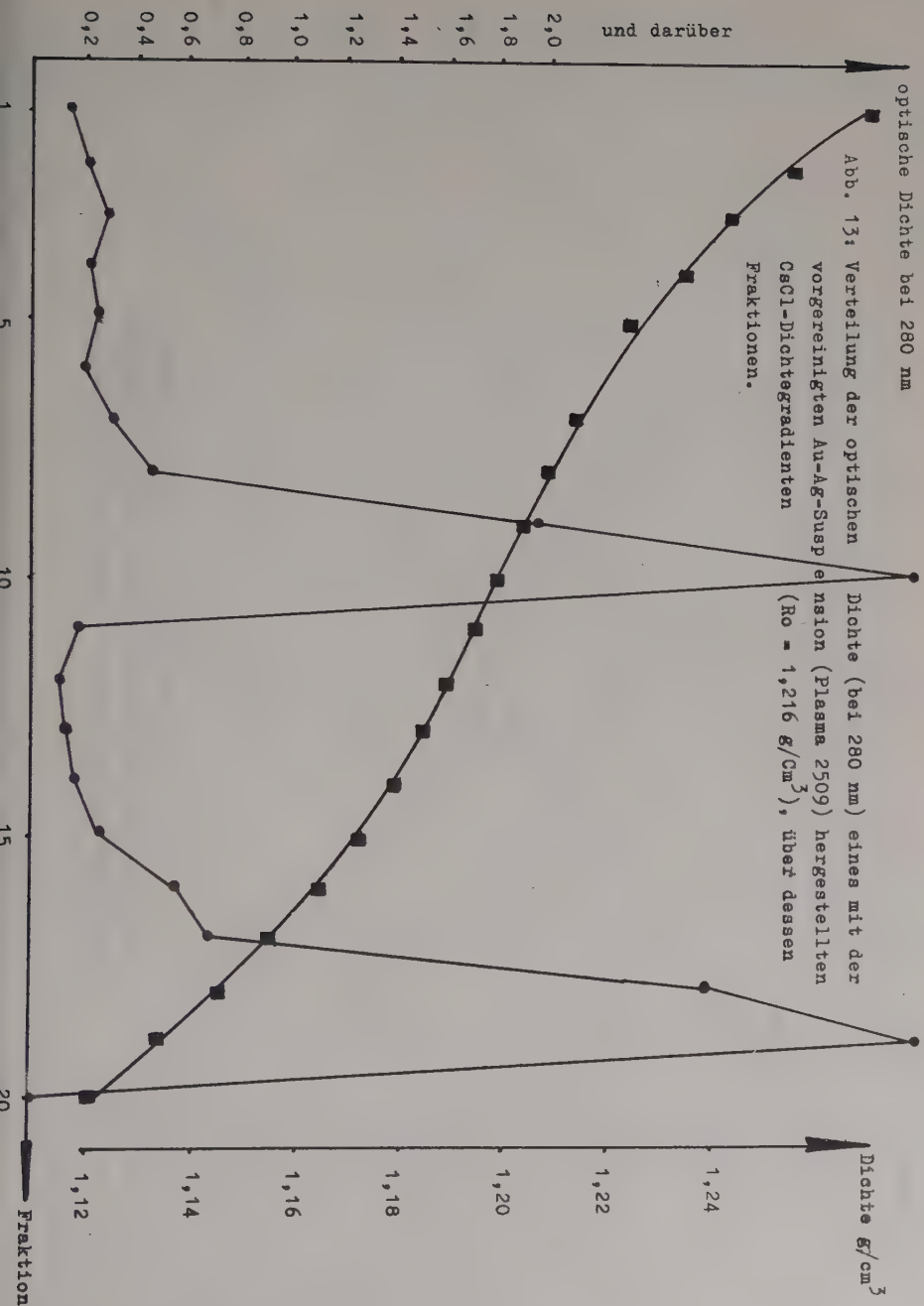
Die durch Gelfiltration und Entsalzung vorgereinigten und konzentrierten Plasmaproben Nr. 2509 und 3751 wurden einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Die Dichtegradienten-Fractionen der Proben 2509 wurden mit dem Spektralphotometer PMQ II (Fa. Carl ZEISS) auf ihre optische Dichte hin untersucht (Abb. 13). Die Gradienten-Fractionen beider Proben wurden nach der Dialysierung gegen Phosphatpuffer mittels KBR, EPT und IDT auf ihren Au-Ag-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 und 8, Abb. 14 und 15 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Quantitativer und qualitativer Nachweis des Au-Ag in den Fraktionen des Dichtegradienten mit der vorgereinigten Probe 2509.

Fraktion	Dichte g/cm ³	IDT	EPT	KBR
1	1,274	Ø	Ø	Ø
2	1,258	Ø	Ø	Ø
3	1,245	Ø	Ø	Ø
4	1,231	Ø	Ø	Ø
5	1,225	Ø	Ø	Ø
6	1,220	Ø	Ø	Ø
7	1,215	Ø	Ø	Ø
8	1,210	Ø	+++	1:8
9	1,205	++++	++++	1:64
10	1,200	++++	++++	1:64
11	1,195	Ø	++	1:8
12-20	1,190-1,120	Ø	Ø	Ø

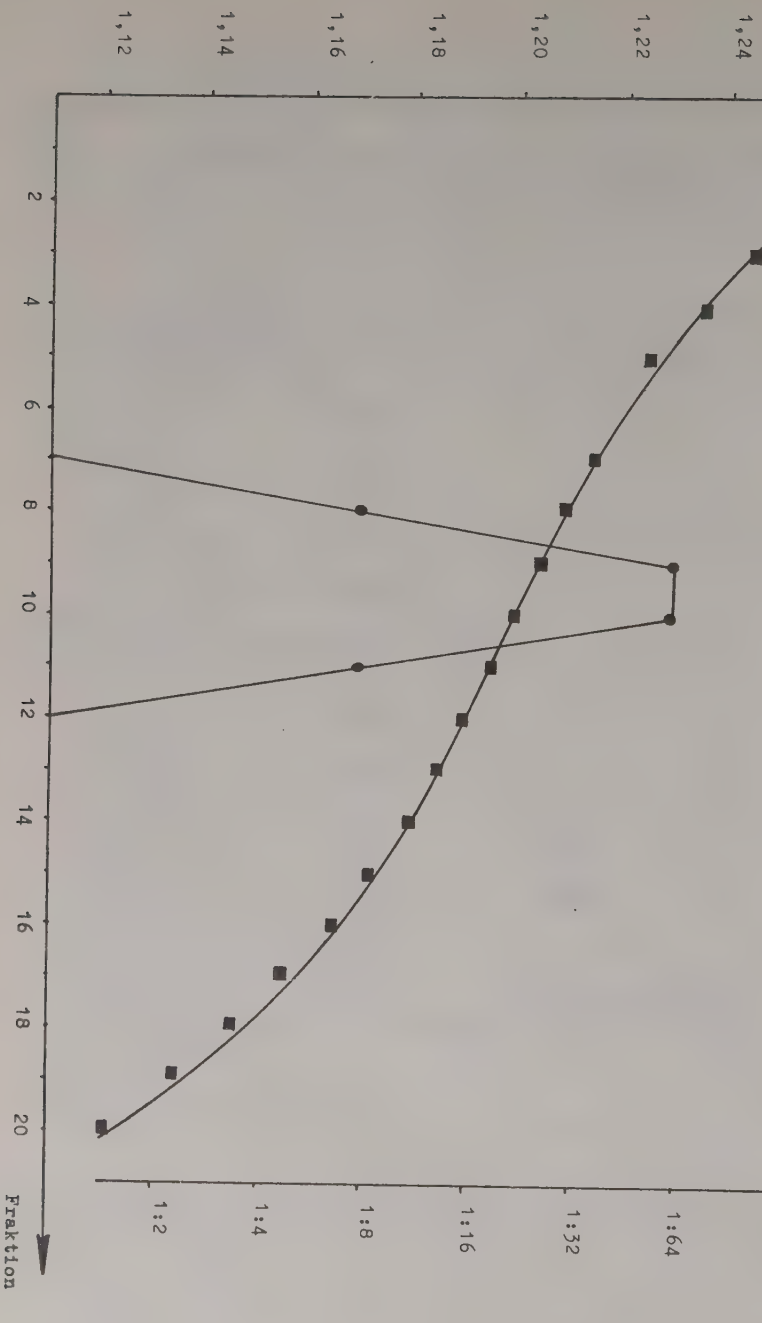
Tabelle 8: Quantitativer und qualitativer Nachweis des Au-Ag in den Fraktionen des Dichte-
gradienten mit der vorgereinigten Probe
3751.

Fraktion	Dichte g/cm ³	IDT	EPT	KBR
1	1,275	Ø	Ø	Ø
2	1,263	Ø	Ø	Ø
3	1,255	Ø	Ø	Ø
4	1,249	Ø	Ø	Ø
5	1,240	Ø	Ø	Ø
6	1,232	Ø	+	1:2
7	1,225	Ø	++	1:4
8	1,215	Ø	+++	1:8
9	1,209	++++	++++	1:64
10	1,205	++++	++++	1:128
11	1,200	++++	++++	1:256
12	1,195	++++	++++	1:128
13	1,187	Ø	+++	1:8
14-20	1,177-1,110	Ø	Ø	Ø



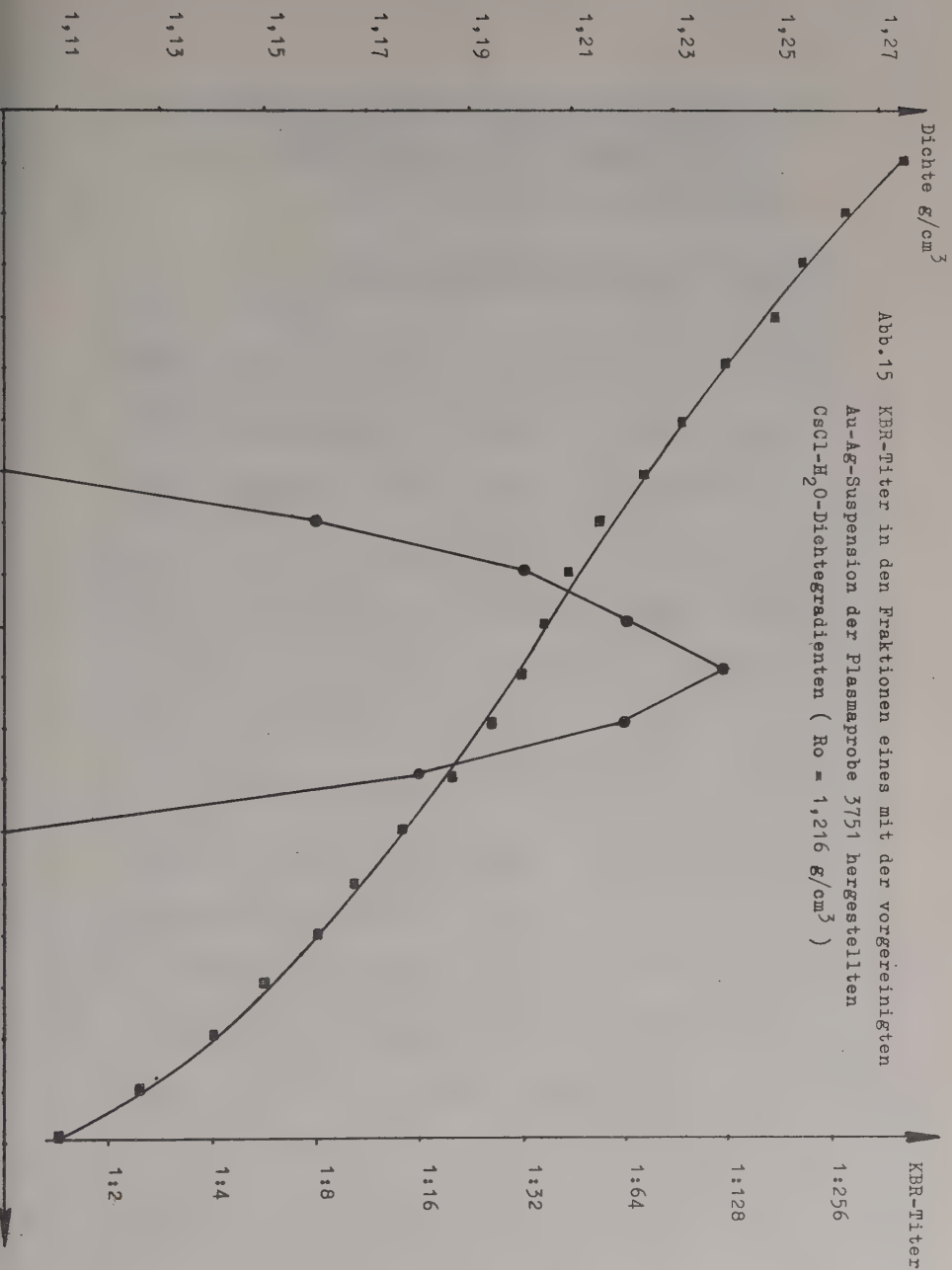
Dichte g/cm^3

Abb. 14 KBR-Titer in den Fraktionen eines mit der vorgereinigten Au-Ag-Suspension der Probe 2509 hergestellten $\text{CsCl-H}_2\text{O}$ -Dichtegradienten ($R_0 = 1,216 \text{ g/cm}^3$).



KBR-Titer

Fraktion



3.2.2 Trennung durch kombinierte Chromatographie

(mit Sephadex G 200 und anschließend mit
Sepharose 4 B)

3.2.2.1 Trennung durch Sephadex G 200

8 x 25 ml der Probe Nr. 80723 und 8 x 25 ml der Probe Nr. 77403, die nach der unter 2.2.2 beschriebenen Anordnung wegen ihres starken Lipidgehaltes mit Frigen 113 behandelt worden waren, wurden nacheinander durch die Sephadex G 200-Säule gepumpt. Von den Au-Ag-haltigen Fraktionen (jeweils den ersten sieben) der 8 Proben des Plasmas Nr. 80723 wurde ein Pool und von denjenigen der 8 Proben des Plasmas Nr. 77403 wurden 7 Pools (d.s.: erster Pool = 8 x Fraktion 1, zweiter Pool = 8 x Fraktion 2, dritter Pool 8 x Fraktion 3 u.s.f.) hergestellt. Die notwendige weitere Konzentrierung erfolgte durch Dialysierung gegen Polyäthylenglycol. Der Pool Nr. 80723 wurde auf 35 ml eingeeengt, die ich in 3 x 10 ml und 1 x 5 ml aufteilte. Die sieben Pools der Probe Nr. 77403 wurden bis auf je 10 ml eingeeengt, sodaß ich daraus 7 konzentrierte Proben erhielt. Der Nachweis des Antigens wurde im IDT, EPT und mit der KBR geführt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Au-Ag-Nachweis in den Reinigungsstufen der
Plasmaprobe Nr. 77403 (8 Sephadex G 200/
Säulenchromatographisch getrennte Proben
und Pools aus Au-Ag-positiven Fraktionen)

Untersuchungsmaterial	IDT	EPT	KBR
77403 Plasma	++++	++++	1:16
77403 Plasma, Frigen behandelt	+++	++++	1:16
77403 Plasma, Frigen behandelt, 1:2 verdünnt	+	++++	1:8
77403 Plasma, Frigen behandelt, 1:2 verdünnt, Sephadex G 200 Peak 1, Pools Polyäthyl. konz. Pool 1 (aus den 8 Frakt. Nr.1)	+	++++	1:16
wie oben, Pool 2 (aus den 8 Frakt. Nr.2)	++++	++++	1:32
wie oben, Pool 3 (aus den 8 Frakt. Nr.3)	++++	++++	1:64
wie oben, Pool 4 (aus den 8 Frakt. Nr.4)	++++	++++	1:64
wie oben, Pool 5 (aus den 8 Frakt. Nr.5)	++++	++++	1:32
wie oben, Pool 6 (aus den 8 Frakt. Nr.6)	++++	++++	1:32
wie oben, Pool 7 (aus den 8 Frakt. Nr.7)	++++	++++	1:32

3.2.2.2 Trennung durch Sepharose 4 B

Die nun anschließende chromatographische Trennung der Proben in der Agarose-Säule wurde zuerst mit 3 Proben des Pools 80723 und danach mit den 7 konzentrierten Pools der Probe 77403 vorgenommen. Die automatische Registrierung der UV-Absorption der durch die Sepharose 4 B-Säule gelaufenen Proben ließ jeweils eine Kurve mit drei Peaks erkennen (Abb. 16), die wegen des unterschiedlichen Gehaltes an Proteinen im Absorptionsmaximum stark variierten. Die Trennkurven der 7 Pools der Probe 77403 (Abb. 17 u. 18) sind interessant, da sie aus verschiedenen Eluatsfraktionen hergestellt worden sind. Hieraus ist zu ersehen, daß bei Zunahme der Gesamt-Proteinmenge im Peak II auch der Au-Ag-Gehalt ansteigt (Tabelle 10).

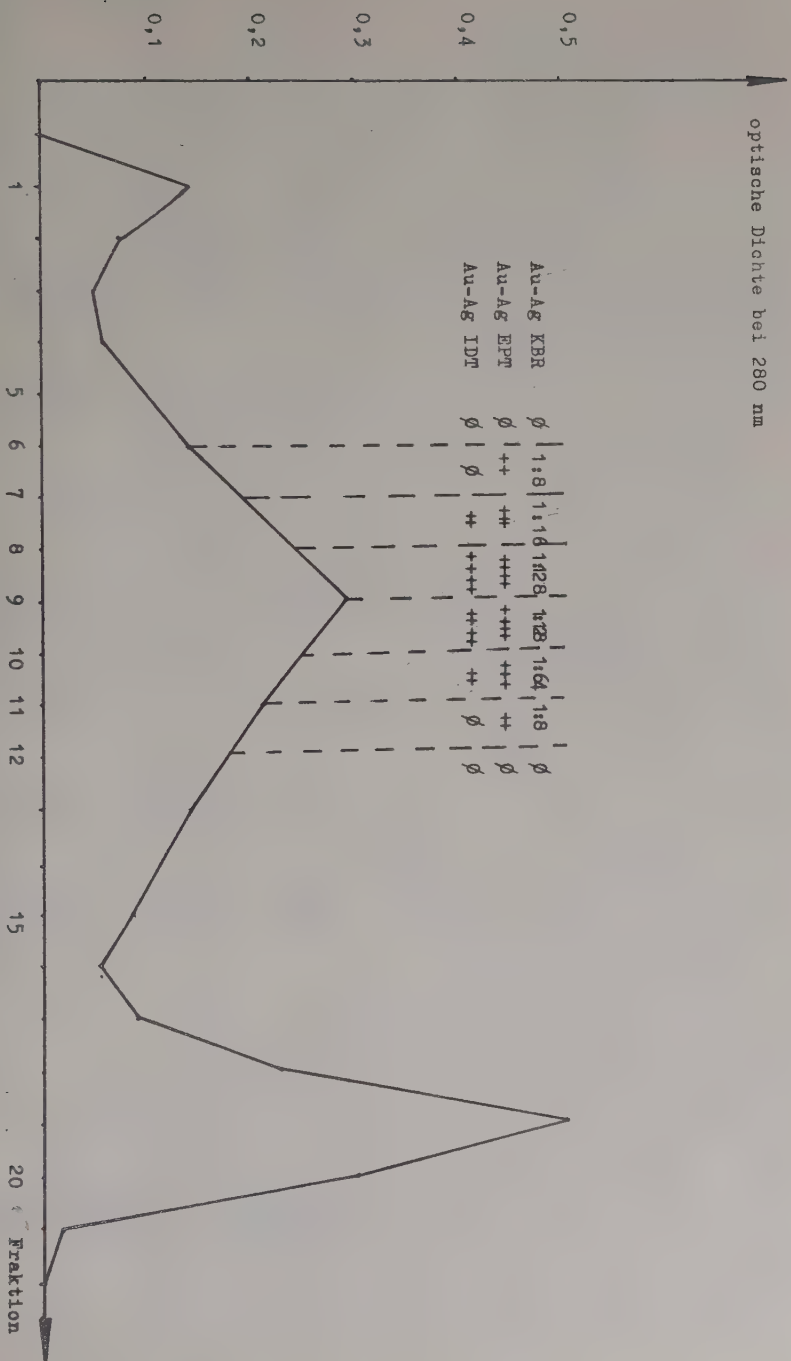


Abb. 16 Schematische Darstellung der Trennung der Probe 80723 mittels Sepharose 4 B
Vorkommen des Au-Ag in den einzelnen Fraktionen.

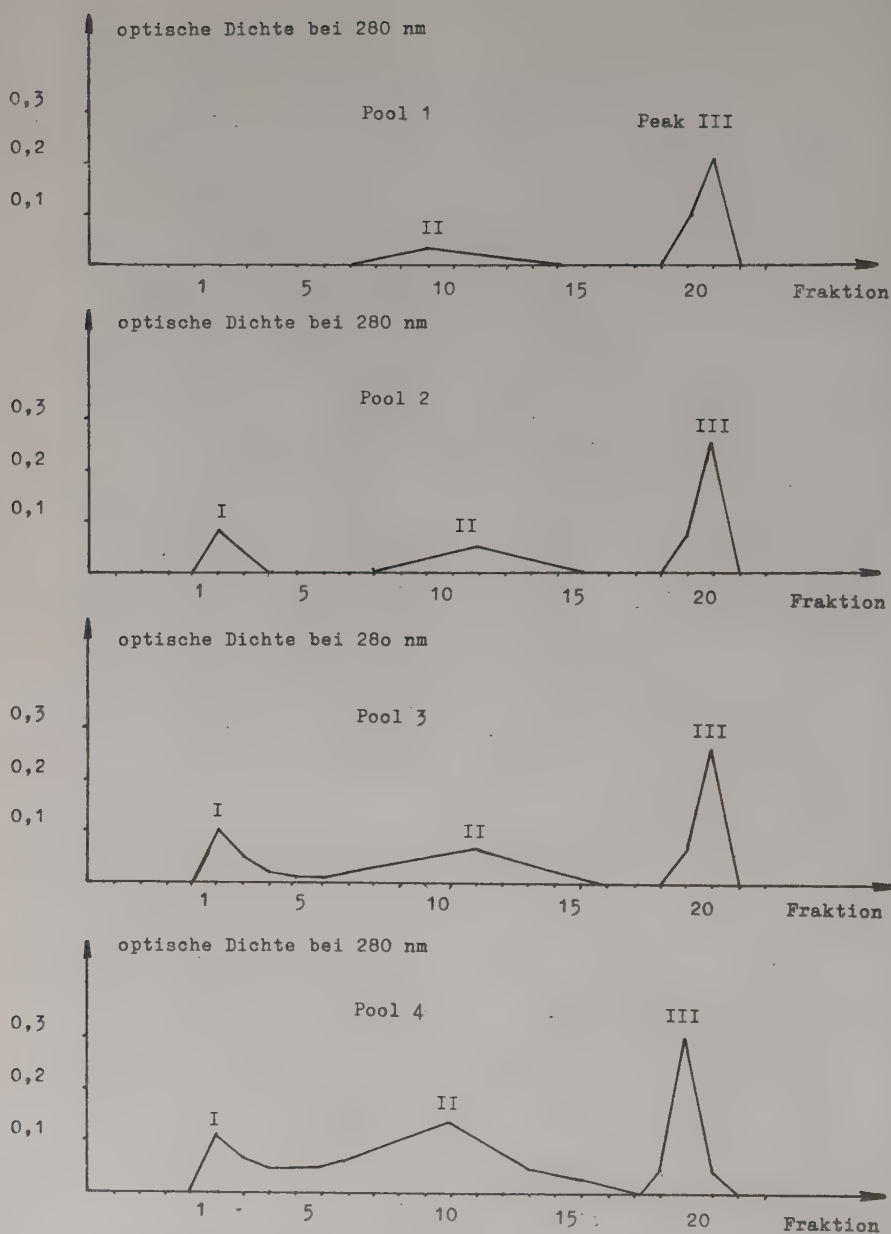


Abb.17 Schematische Darstellung der Trennkurven mit Sepharose
(7 Pools der Probe 77403).

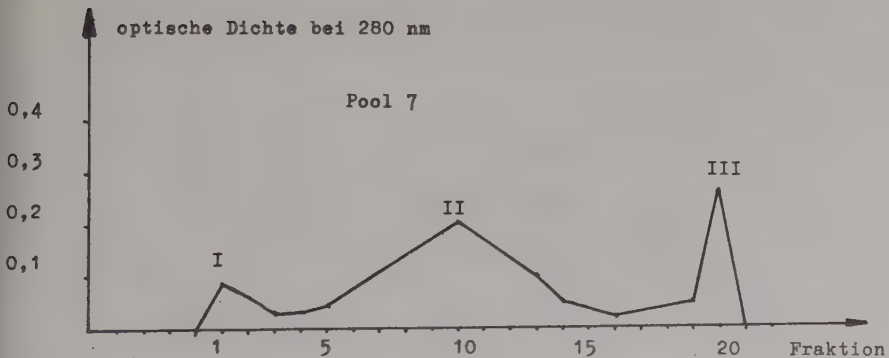
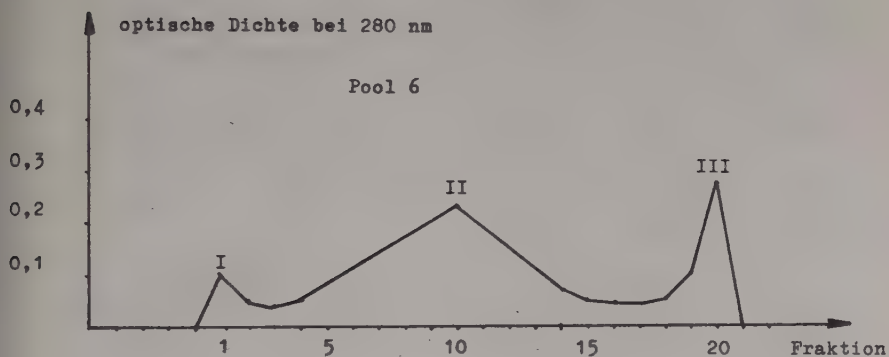
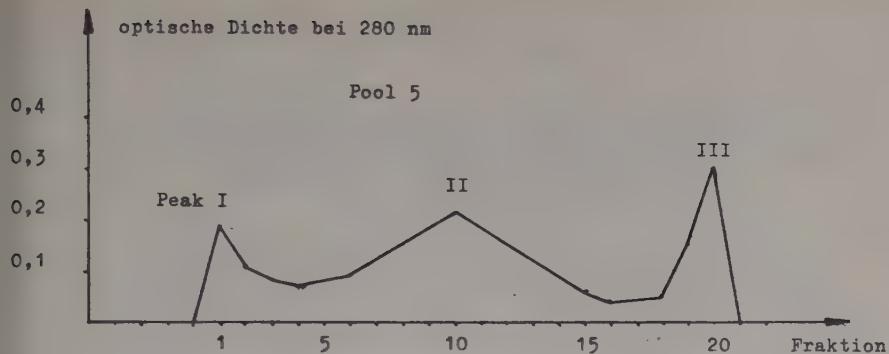


Abb.18 Schematische Darstellung der Trennungskurve mit
Sephacrose 4 B (7 Pools der Probe 77403 /.

Tabelle 10: Qualitativer und quantitativer Au-Ag-Nachweis im Sepharose 4B-gereinigten Material des Plasma 77403

Untersuchtes Material	IDT	EPT	KBR
8 x Probe 77403, G 200, Pool 1 aus 8 x Fr. 1, Polyäthyl. konz., Sephar.4B, <u>Peak II</u> (Polyäthyl. konz.)	Ø	Ø	Ø
8 x Probe 77403, G 200, Pool 2 aus 8 x Fr. 2, Polyäthyl. konz., Sephar.4B, <u>Peak II</u> (Polyäthyl. konz.)	Ø	+++	1:8
8 x Probe 77403, G 200, Pool 3 aus 8 x Fr. 3, Polyäthyl. konz., Sephar.4B, <u>Peak II</u> (Polyäthyl. konz.)	+++	++++	1:32
8 x Probe 77403, G 200, Pool 4 aus 8 x Fr. 4, Polyäthyl. konz., Sephar.4B, <u>Peak II</u> (Polyäthyl. konz.)	++++	++++	1:32
8 x Probe 77403, G 200 Pool 5 aus 8 x Fr. 5, Polyäthyl. konz., Sephar.4B, <u>Peak II</u> (Polyäthyl. konz.)	++	++++	1:16
8 x Probe 77403, G 200, Pool 6 aus 8 x Fr. 6, Polyäthyl. konz., Sephar.4B, <u>Peak II</u> (Polyäthyl. konz.)	+++	++++	1:16
8 x Probe 77403, G 200 Pool 7 aus 8 x Fr. 7, Polyäthyl. konz., Sephar.4B, <u>Peak II</u> (Polyäthyl. konz.)	Ø	++	1:8

3.2.2.4 Untersuchung des Reinheitsgrades der doppel- chromatographierten Proben

Die 22 Fraktionen der durch die Agarose-Chromatographie (Abb. 16) getrennten 3 Proben des Pools 80723 wurden zu 13 Teilproben vereinigt, wie in Tabelle 12 angegeben. Dann engte ich sie gegen Polyäthylenglycol bis auf je 10 ml ein und untersuchte sie auf ihren Au-Ag-Gehalt. Außerdem stellte ich von den Fraktionen 1 + 2, 8 - 13 und 19 - 21 der 7 Pools von 77403 (3.2.2.2) (Abb. 17 u. 18) ebenfalls Teilpools her und engte sie mit Polyäthylenglycol auf die halbe Menge ein.

Von jeder Reinigungsstufe benützte ich 0,2 ml des Materials zum quantitativen und qualitativen Au-Ag-Nachweis in der KBR, EPT und IDT (Tabelle 13 u. 14). Zur Beurteilung des Reinigungseffektes der verschiedenen Verfahren wurden die Proben schließlich immunoelektrophoretisch auf ihren Proteingehalt untersucht (Abb. 19, 20 u. 21).

Tabelle 12: Gepoolte Fraktionen der drei mit Sepharose 4 B chromatographierten
Proben (8 x Plasma Nr. 80723, G 200, Peak 1, gepoolt, Polyäthyl-konz.,
3 x 10 ml Proben)

Probe 1	Volumen der Prob. unkonz.	Prob. konz.	Au-Ag-Nachweis, KBR-Titer	Test-Ergebnis EPT	IDT
Fr. 1-5 (Teil 1)	65 ml	11 ml	Ø	Ø	Ø
Fr. 6-10 (Teil 2)	65 ml	11 ml	1:32	++++	+++
Fr. 11-16 (Teil 3)	70 ml	12 ml	1:16	++++	+++
Fr. 17-21 (Teil 4)	65 ml	8 ml	Ø	+	Ø
Probe 2					
Fr. 1-5 (Teil 1)	65 ml	10 ml	Ø	+	Ø
Fr. 6-13 (Teil 2)	100 ml	11 ml	1:64	++++	+++
Fr. 14-16 (Teil 3)	40 ml	10 ml	1:8	+	Ø
Fr. 17-21 (Teil 4)	65 ml	11 ml	Ø	Ø	Ø
Probe 3					
Fr. 1-3 (Teil 1)	40 ml	10 ml	Ø	Ø	Ø
Fr. 4-6 (Teil 2)	40 ml	10 ml	1:16	++++	+++
Fr. 7-12 (Teil 3)	80 ml	11 ml	1:64	++++	+++
Fr. 13-16 (Teil 4)	50 ml	10 ml	1:8	+	Ø
Fr. 17-21 (Teil 5)	65 ml	10 ml	Ø	Ø	Ø

Tabelle 13: Vergleichende Untersuchung der verschiedenen Reinigungsstufen der Plasmaprobe 80723

Untersuchungs- material	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
	KBR	EPT	IDT	KBR	EPT	IDT	KBR	EPT	IDT
80723 Plasma	1:32	++++	+++	1:32	++++	++++	1:32	++++	++++
80723 Plasma Frigen behandelt	1:32	++++	+++	1:32	++++	++++	1:32	++++	++++
80723 Plasma Frigen behandelt, 1:2 verdünnt	1:16	++++	++	1:16	++++	+++	1:16	++++	+
80723 Plasma Frigen behandelt, 1:2 verdünnt, Sephadex G 200 Peak 1	1:4	+++	Ø	1:4	++	Ø	1:4	++	Ø
80723 Plasma Frigen behandelt, 1:2 verdünnt, Sephadex G 200 Peak 1, Dial.konz.	1:64	++++	++++	1:64	++++	++++	1:64	++++	++++

3.3 Resultate der Immunisierungen von Meerschweinchen

Alle gereinigten und konzentrierten Proben wurden je nach vorhandenem Volumen in ein oder zwei Meerschweinchen inokuliert. Diese umfangreichen Immunisierungen von Tieren mußte ich vornehmen, um die Erfolge der verschiedenartigen Antigenreinigungen bzw. die spezifische Antigenität der gewonnenen Materialien beurteilen zu können.

3.3.1 Tiere, denen ein Antigen-Adjuvansgemisch und intracardial Euglobulin injiziert wurde

Mit gereinigtem und konzentriertem Material (Sephadex G 200, Ultrazentrifugation) der Plasmaproben 3600, 3751, 4676 und 80752 wurden jeweils 2 Meerschweinchen auf vorher unter 2.4.1 beschriebene Weise immunisiert. Au-Ag-positive Antiseren (Antikörper-Nachweis im EPT und IDT) konnten mit den Proben 3600, 3751 und 80752 erhalten werden. Allerdings mußte, trotz der Versuche, mit dem von MADALINSKI et al. (57) angegebenen Verfahren eine Immun-Toleranz für normale menschliche Plasma-Proteine zu erzeugen, die entstandene starke unspezifische Reaktion gegen diese Proteine durch Adsorption der Antiseren mit Au-Ag-negativem humanem Plasma beseitigt werden. Überraschenderweise waren im Serum der

2 Meerschweinchen, die mit Antigen der Plasmaprobe Nr. 4676 immunisiert worden waren, keine Antikörper gegen Au-Ag nachweisbar (Tabelle 14).

3.3.2 Normal immunisierte Tiere

Die Antiseren der 2 Meerschweinchen, die mit Impfmateri-
al aus der zusätzlich durch Dichtegradienten gerei-
nigten Probe Nr. 3751 hergestellt worden waren, rea-
gierten trotz des hohen Reinigungsgrades des Inokulums
ebenfalls mit normalen menschlichen Serumproteinen.
Nach einer Adsorption mit Au-Ag-negativem Humanplasma
ergaben auch diese Seren weitgehend spezifische Prä-
zipitationslinien. Das nur in üblicher Weise gereinig-
te Material (Sephadex G 200 Peak 1, Proteinfällung
durch Dialyse, Polyäthylenglycol konz.) der Probe 2509
wurde 4 und das der Probe 3600 und 80752 je 2 Meer-
schweinchen inokuliert.

Die gewonnenen Antiseren mußten ebenfalls mit humanem
Plasma adsorbiert werden, reagierten dann aber ebenso
wie die Seren der übrigen Tiere, im EPT und IDT zu-
friedenstellend spezifisch (Tabelle 15).

Tabelle 14: Ergebnisse der 8 in Meerschweinchen hergestellten Anti-Au-Ag-Seren
(EPT und IDT, positives Antigen: gereinigte Au-Ag-haltige Proben,
negatives Antigen: Au-Ag-negatives Plasma)

		Antiserum							
Antigen	Teste	Immunis.Meerschw. m. ger. Pr. 3600		Immunis.Meerschw. m. ger. Pr. 3751		Immunis.Meerschw. m. ger. Pr. 4676		Immunis.Meerschw. m. ger. Pr. 80752	
		M 702	M 781	M 773	M 774	M 706	M 708	M 787	M 788
3600 Au-Ag positiv	EPT	++++	++++	++++	++++	Ø	Ø	++++	++++
	IDT	++++	+++	++++	++++	Ø	Ø	++++	++++
3751 Au-Ag positiv	EPT	++++	++++	+++++	++++	Ø	Ø	++++	++++
	IDT	++++	++++	++++	++++	Ø	Ø	++++	++++
4676 Au-Ag positiv	EPT	++++	+++	++++	++++	Ø	Ø	++++	++++
	IDT	++++	++	+++	+++	Ø	Ø	+++	+++
51340 Au-Ag negativ	EPT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	IDT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tabelle 15: Ergebnisse der 8 in Meerschweinchen hergestellten Anti-Au-Ag-Seren
(EPT und IDT, positives Antigen: gereinigte Au-Ag-haltige Proben,
negatives Antigen: Au-Ag-negatives Plasma)

		Antiserum							
Antigen	Teste	Immunisierte Meerschweinchen mit gereinigter Probe 2509				Immunis. Meerschw. m. ger. pr. 3600			
		M 353	M 354	M 355	M 356	M 357	M 358	M 359	M 360
2509 Au-Ag positiv	EPT	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	IDT	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3600 Au-Ag positiv	EPT	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	IDT	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	++++
80752 Au-Ag positiv	EPT	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	IDT	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
51340 Au-Ag negativ	EPT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	IDT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Wegen der geringen verfügbaren Mengen wurde mit den Proben von Plasma Nr. 80723 und 77403 (Sephadex G 200, Peak 1, Dial. konz., Sepharose 4 B in mehreren Teilen konz.) (Tabelle 16 und 17) jeweils nur ein Meerschweinchen immunisiert. Die hierbei verwendeten Impfmaterialien waren nicht alle Au-Ag-positiv. Die negativen Materialien wurden mit dem Ziel inokuliert, auch für die Proteine der beiden weiteren Peaks des Eluates spezifische Antiseren zu erhalten.

Die Ergebnisse nach Adsorption mit humanem Plasma fielen, abhängig von der Au-Ag-Konzentration im Impfmaterial, unterschiedlich intensiv aus und sind in Tabelle 18, 19 und 20 angegeben.

Ein Versuch zur Bestimmung der Antikörpertiter mittels KBR schlug fehl, da sämtliche Antiseren starke antikomplementäre Eigenschaften aufwiesen.

Tabelle 16: Aufstellung der Meerschweinchen, die mit den gepoolten Fraktionen der drei mit Sepharose 4 B chromatographierten Proben 80723 immunisiert worden sind

Probe 1	Volumen	Au-Ag- KBR-Titer	Meerschwein- chen-Nr.
Fr. 1- 5 (Teil 1)	11 ml	Ø	340
Fr. 6-10 (Teil 2)	11 ml	1:32	341
Fr.11-16 (Teil 3)	12 ml	1:16	342
Fr.17-21 (Teil 4)	8 ml	Ø	343
Probe 2			
Fr. 1- 5 (Teil 1)	10 ml	Ø	344
Fr. 6-13 (Teil 2)	11 ml	1:64	345
Fr.14-16 (Teil 3)	10 ml	1:8	346
Fr.17-21 (Teil 4)	11 ml	Ø	347
Probe 3			
Fr. 1- 3 (Teil 1)	10 ml	Ø	348
Fr. 4- 6 (Teil 2)	10 ml	1:16	349
Fr. 7-12 (Teil 3)	11 ml	1:64	350
Fr.13-16 (Teil 4)	10 ml	1:8	351
Fr.17-21 (Teil 5)	10 ml	Ø	352

Tabelle 17: Australia-Antigen-Nachweis im Impfmateriail, das aus Sephadex G 200 und Sepharose 4 B chromatographisch getrennten Plasma 77403 herge- stellt wurde (3.2.2.4)

Untersuchungs- material	Au-Ag-Nachweis			Meerschwein- chen Nr.
	KBR	EPT	IDT	
Pool 1 Sephärose 4 B chrom.	Teil 1 (Peak I)	Ø	Ø	379
	Teil 2 (Peak II)	Ø	Ø	380
	Teil 3 (Peak III)	Ø	Ø	381
Pool 2 Sephärose 4 B chrom.	Teil 1 (Peak I)	Ø	Ø	382
	Teil 2 (Peak II)	1:8	+++	383
	Teil 3 (Peak III)	Ø	Ø	384
Pool 3 Sephärose 4 B chrom.	Teil 1 (Peak I)	Ø	Ø	385
	Teil 2 (Peak II)	1:32	+++	386
	Teil 3 (Peak III)	Ø	Ø	387
Pool 4 Sephärose 4 B chrom	Teil 1 (Peak I)	Ø	Ø	388
	Teil 2 (Peak II)	1:32	+++	389
	Teil 3 (Peak III)	Ø	Ø	390

Fortsetzung Tabelle 17:

Untersuchungs- material	Au-Ag-Nachweis KBR	Testergebnisse EPT	Testergebnisse IDT	Meerschwein- chen Nr.
Pool 5				
Teil 1 (Peak I)	Ø	Ø	Ø	391
Teil 2 (Peak II)	1:16	+++	+++	392
Teil 3 (Peak III)	Ø	Ø	Ø	393
Pool 6				
Teil 1 (Peak I)	Ø	Ø	Ø	394
Teil 2 (Peak II)	1:16	+++	++	395
Teil 3 (Peak III)	Ø	Ø	Ø	396
Pool 7				
Teil 1 (Peak I)	Ø	Ø	Ø	397
Teil 2 (Peak II)	1:8	++	Ø	398
Teil 3 (Peak III)	Ø	Ø	Ø	399

Tabelle 18: Ergebnis des Elektrophorese Präzipitations- und Immunodiffusionstestes
mit 13 in Meerschweinchen hergestellten Antiseren (Plasmaprobe Nr. 80723)
(Tabelle 16)

		Antiserum												
		Meerschweinchen Nr.												
Proben	Teste	M 340	M 341	M 342	M 343	M 344	M 345	M 346	M 347	M 348	M 349	M 350	M 351	M 352
77403 Au-Ag positiv	EPT	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	+++	++++	Ø	Ø
	IDT	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	+	++++	Ø	Ø
80723 Au-Ag positiv	EPT	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++	++++	Ø	Ø
	IDT	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø
2509 Au-Ag positiv	EPT	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++++	++++	Ø	Ø
	IDT	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	Ø	++	++++	Ø	Ø
51340 Au-Ag negativ	EPT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	IDT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Antigen

Tabelle 19 und 20: Ergebnisse des EPT und IDT mit 21 in Meerschweinchen hergestellten Antiseren (Plasma Nr. 77403) (Tabelle 17). Resultate der ersten 11 Antiseren

Antiserum

Proben	Teste	M 379	M 380	M 381	M 382	M 383	M 384	M 385	M 386	M 387	M 388	M 389
Meerschweinchen Nr.												
77403	EPT	Ø	Ø	Ø	Ø	++	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	++++
	IDT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	++++
80723	EPT	Ø	Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	++++
	IDT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	++++
2509	EPT	Ø	Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	++++
	IDT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	++++	Ø	Ø	+++
51340	EPT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	IDT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Antigen

Tabelle 20: Resultate von weiteren 10 Antiseren

		Antiserum									
Proben	Teste	Meerschweinchen Nr.									
		M 390	M 391	M 392	M 393	M 394	M 395	M 396	M 397	M 398	M 399
77403 Au-Ag positiv	EPT	Ø	Ø	+++	Ø	Ø	+++	Ø	Ø	Ø	Ø
	IDT	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
80723 Au-Ag positiv	EPT	Ø	Ø	+++	Ø	Ø	++	Ø	Ø	Ø	Ø
	IDT	Ø	Ø	++	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
2509 Au-Ag positiv	EPT	Ø	Ø	+++	Ø	Ø	+++	Ø	Ø	Ø	Ø
	IDT	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
51340 Au-Ag negativ	EPT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	IDT	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Antigen

Abb. 19: Ergebnisse der Immunelektrophoreseteste mit verschiedenen gereinigten Stufen der Plasmaprobe 80723 (Material der Tabelle 12).

1. Plasma 80723
2. Plasma 80723, Frigenbehandelt
3. Plasma 80723, Frigenbehandelt, G 200 Peak I, Dial. Konz.
4. Plasma 80723, Frigenbehandelt, G 200 Peak I, Dial. Konz., 3 x 10 ml Proben, Sepharose 4 B,
4. Teil 1 (Fr. 1- 5)
5. Teil 2 (Fr. 6-13)
6. Teil 3 (Fr.14-16)
7. Teil 4 (Fr.17-21)
8. Teil 1 (Fr. 1- 5)
9. Teil 2 (Fr. 6-13)
10. Teil 3 (Fr.14-16)
11. Teil 4 (Fr.17-21)
12. Teil 1 (Fr. 1- 3)
13. Teil 2 (Fr. 4- 6)
14. Teil 3 (Fr. 7-12)
15. Teil 4 (Fr.13-16)
16. Teil 5 (Fr.17-21)

Probe 1

Probe 2

Probe 3

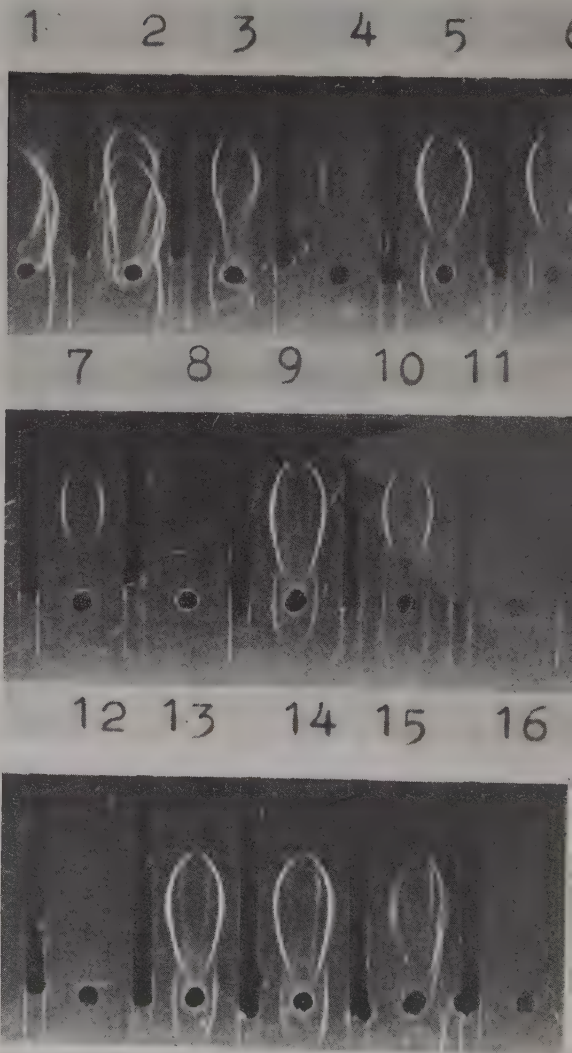


Abb. 20: Ergebnisse der Immunoelktrophoreseteste mit 7 Pools der Sephadex G 200-getrennten PlasmaProbe Nr. 77403 (Material in Tabelle 10 detailliert aufgeföhrt).

1. Plasma 77403
2. Plasma 77403,
G 200 Peak I, Pool 1
3. wie oben Pool 2
4. wie oben Pool 3
5. wie oben Pool 4
6. wie oben Pool 5
7. wie oben Pool 6
8. wie oben Pool 7

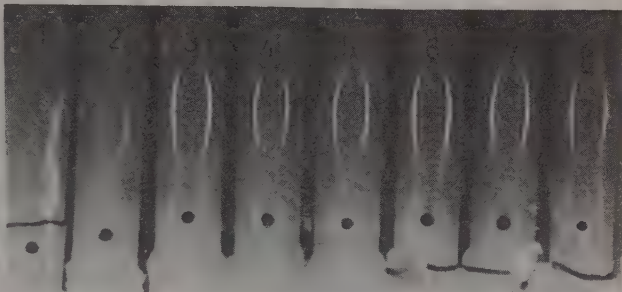
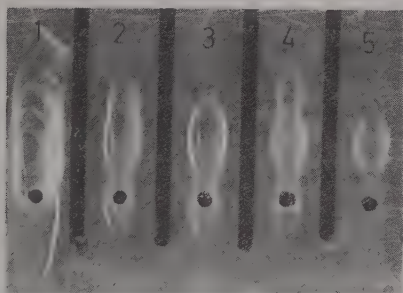


Abb. 21: Ergebnisse der Immunoelktrophorese der mit Sepharose 4 B säulenchromatographisch getrennten obigen Pools-Nr. 6.

1. Plasma 77403
2. Plasma 77403,
G 200 Peak 1,
Pool 6, Konz.
3. Plasma 77403,
G 200 Peak 1,
Pool 6, Konz.,
Sepharose 4 B, Peak I
4. wie oben Peak II
5. wie oben Peak III



D. Diskussion

Die von mir benützten Plasmakonserven wiesen nur geringe Au-Ag-Mengen auf (Tabelle 1). Dies entspricht den Befunden, die normalerweise bei gesunden Au-Ag-Trägern festgestellt werden. Au-Ag-Ämie mit hohen Titern werden nur bei Patienten mit akuter Virushepatitis auf dem Höhepunkt der Erkrankung und bei Kranken unter immunsuppressiver Therapie beobachtet. Die Verwendung solcher hochtiterigen Proben für meine anfangs beschriebenen Zwecke wäre sehr vorteilhaft gewesen. Vom ärztlichen Standpunkt aus kann jedoch die Abnahme der benötigten Menge Blutes von diesen meist schwerkranken Patienten nicht verantwortet werden. Die bei Routineuntersuchungen anfallenden und deshalb für mich verfügbaren Probenmengen derartiger Patienten beliefen sich im Durchschnitt auf 0,5 bis 2 ml, die einzeln für mein Vorhaben nicht ausreichten. Aus zahlreichen derartigen Proben einen hochtiterigen "Pool" herzustellen, verbot sich, weil durch diese Mischung von vielerlei Einzelproben wahrscheinlich ein Gemisch der verschiedenen Au-Ag-Untertypen entstanden wäre. Dies hätte a priori die Herstellung von monospezifischen Anti-Au-Ag-Seren unmöglich gemacht.

Die vorangehenden Versuche zur Reinigung und Konzentrierung des Au-Ag wurden unter Bedingungen durchgeführt, bei denen das Antigen seine immunologischen Eigenschaften beibehält, die auch für seinen Nachweis notwendig sind.

Bei dem Isolierungs- und Anreicherungsversuch durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (Versuch 3.1) wurde das Antigen in verschiedener Menge in allen Fraktionen vorgefunden.

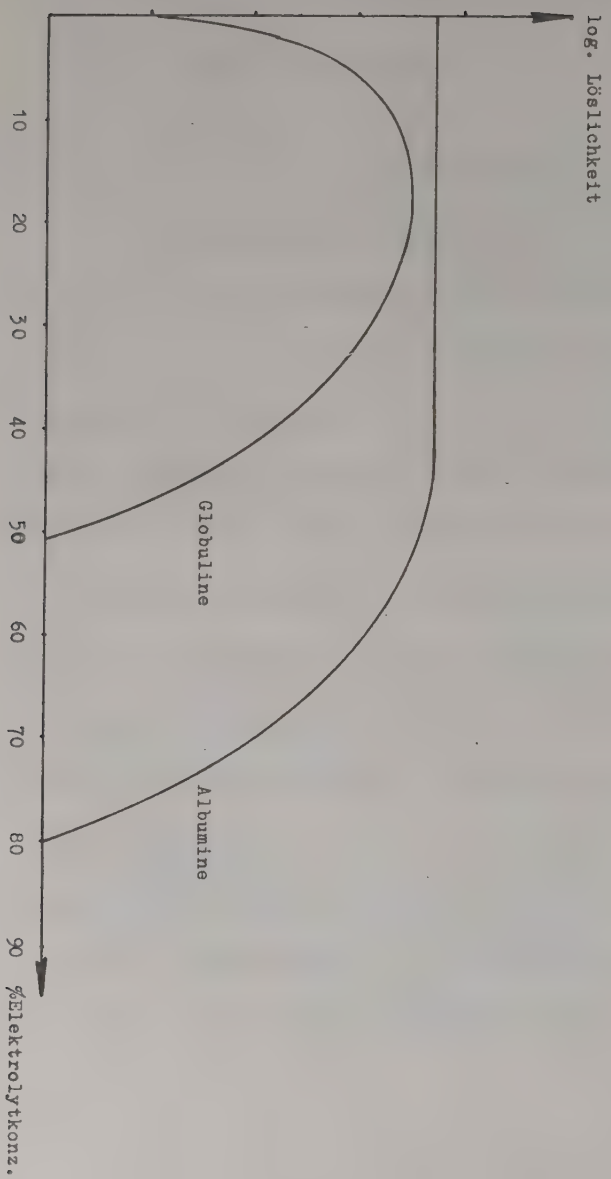
Dies spricht für eine uneinheitliche Löslichkeit der Au-Ag-Teilchen.

Die Elektrolytkonzentration ist für die Löslichkeit der Proteine von Wichtigkeit: zum einen gibt es Eiweiße, die bei Abwesenheit von Salzen ausfallen (die Globuline) und zum anderen solche, die sich in reinem Wasser lösen (die Albumine). Elektrolytkonzentrationen, die bei den einen Proteinen zur Lösung führen können, bei den anderen eine Ausfällung verursachen. Das Lösen der Proteine durch Salzzusatz wird als "salting in" (Einsalzen) bezeichnet, das Fällern durch Erhöhung der Salzkonzentration als "salting out" (Aus-salzen).

Der "Aussalz"-Effekt tritt bei allen löslichen Proteinen auf. Je nach Molekulargewicht, Teilchengestalt und Ladungszustand entstehen aber die kritischen Fällungsgrenzen bei verschiedener Salzkonzentration. Diese Unterschiede werden zur fraktionierten Trennung von Eiweißgemischen wie Serum oder Plasma benutzt.

Hier benötigt man zum Beispiel für das Aussalzen der Albumine annähernd eine Ganzsättigung, dagegen werden Globuline bereits bei Halbsättigung zur Fällung gebracht (Abb. 22). Die unterschiedliche Löslichkeit der Au-Ag-Teilchen, die

Abb. 22: Löslichkeit von Albuminen und Globulinen als Funktion der Elektrolytkonzentration.



bei meinen Aussalzungs-Versuchen zu beobachten war, führt zu der Überlegung, ob hier nicht ein Gemisch von Antigen-
teilchen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, Ladungs-
zustand und verschiedener Teilchengestalt vorliegt, die
bei Erreichen ihrer kritischen Löslichkeits-Grenzen zur
Ausfällung gelangen.

Versuche zur direkten Konzentrierung des Au-Ag aus Plasma-
konserven durch hochtourige Zentrifugation (180 Minuten
bei 110 000 g) ergaben nachteilige Phänomene: Einmal wurde
festgestellt, daß das Antigen in Verbindung mit Fibrinogen
zu schwer resuspendierbaren Aggregaten sedimentierte. Wei-
terhin stellte sich heraus, daß eine vollständige Sedimen-
tation des Au-Ag aus einer Plasma-Probe nur durch mehrmalig
wiederholte Zentrifugation oder wegen der hohen Viskosität
des Plasmas durch Erhöhung der Zentrifugationsdauer um das
Dreifache möglich war, was wiederum zur Sedimentation von
fast allen Plasmaproteinen führte.

Die Aggregation des Antigens machte sich bei der Trennung
durch Gelfiltration äußerst ungünstig bemerkbar. Deshalb
wurde die gelchromatographische Trennung des Au-Ag von den
übrigen Plasmaproteinen als erster Schritt angestrebt.

Die Möglichkeit der präparativen Trennung der im Plasma
vorhandenen Proteine durch Chromatographie mit Sephadex
G 200 Gel (33, 53) hat sich auch als schonendes Verfahren
für die Trennung des Au-Ag herausgestellt (59, 70). Wie
auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte (u.a.

Abb. 6 bis 10), tritt das Antigen zusammen mit anderen makromolekularen Plasmaproteinen hauptsächlich dem Alpha-2-Lipoprotein ($MG = 1\,300\,000$), dem Gamma-M-Globulin ($MG = 1000\,000$) und dem Alpha-2-Makroglobulin ($MG = 900\,000$) in der ersten Fraktion des Eluates wieder aus der Chromatographie-Säule aus. Dies war zu erwarten, da Sephadex G 200 für die Trennung von Peptiden und globulären Proteinen mit einem Molekulargewicht von 5000 bis 800 000 bestimmt ist und darüber hinaus keine Trennung herbeiführen kann. Trotzdem stellte dieses Vorgehen für mich einen wesentlichen ersten Schritt zur Reinigung des Au-Ag dar, da ich auf diese Weise die niedermolekularen Plasmaproteine aus meinen Proben entfernen konnte.

Das Verhalten des Au-Ag in dieser Art von Trennsäule ist auch theoretisch gut erklärbar: Für jedes globuläre Partikel läßt sich bei der Säulenchromatographie die Verteilung zwischen den beiden Phasen der Füllungs-masse (dem inneren und äußeren Lösungsmittel) als Verteilungskoeffizient K_{av} ($av = available$) definieren. Dieser stellt eine Funktion der Molekülgröße (oder des Molekulargewichtes) des betreffenden Partikels dar.

Errechnen läßt sich die Konstante K_{av} aus dem Elutionsvolumen V_e.

Das gesamte Volumen V_t einer Sephadex Gel-Säule ergibt sich aus dem Volumen des Elutionsmittels außerhalb des Gels V_o, dem Volumen des Elutionsmittels innerhalb der Gelperlen V_i und dem Volumen der Gelmatrix V_g:

$$V_t = V_o + V_i + V_g$$

Das äußere Volumen V_o ist identisch mit dem Volumen der Flüssigkeit, die nicht in die Gelperlen eindringt und bei Öffnung der Säule diese wieder verläßt. Das innere Volumen V_i läßt sich aus dem Trockengewicht des Gels V_g und dem aufgenommenen Wasser berechnen. Das Elutionsvolumen V_e ist das ausfließende Volumen des Elutionsmittels ab Versuchsbeginn, bis zu dem Augenblick, in dem der zu trennende Stoff die Säule verläßt. Das absolute Elutionsvolumen eines Stoffes wird vom Verteilungskoeffizienten K_{av} bestimmt.

Der Wert K_{av} kann mit Hilfe der Gleichung

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

errechnet werden.

Hier können drei verschiedene Zustände herrschen:

1. Bei großen Teilchen mit einem Molekulargewicht, das oberhalb der Trennungsgrenze liegt, entspricht das V_e dem äußeren Volumen ($V_e = V_o$): K_{av} ist demnach 0.
2. Bei kleinen Teilchen, die sich im äußeren und inneren Volumen des Säulengels frei bewegen, wird $V_e = V_o + V_i$ und $K_{av} = 1$.
3. Bei mittelgroßen Teilchen bestehen Übergangsmöglichkeiten zwischen 1 und 2. Hier sind K_{av} -Werte von 0 bis 1 zu verzeichnen.

Für das Au-Ag ergibt sich demnach ein K_{av} -Wert von 0, was bezeichnend für sein Molekulargewicht von über 800 000 ist.

Nachdem ich festgestellt hatte, daß die durch Sephadex G 200-Chromatographie gewonnenen ersten Fraktionen neben Au-Ag auch andere hochmolekulare Plasmaeiweiße enthielten, versuchte ich, durch eine weitere Aufarbeitung der Proben wie Erniedrigung der Salzkonzentration zur Verminderung der Löslichkeit dieser Begleit-Proteine, ihre Ausfällung zu erreichen und damit den Reinigungseffekt zu verbessern. Auch dieser Schritt führte, trotz erheblicher Ausfällung von Globulinen, nicht zu einem optimalen und vollbefriedigenden Ergebnis.

Eine daran anschließende Dichtegradientenzentrifugation der zwei Proben 2509 und 3751 ergab eine bessere Trennung. Bei diesem Vorgehen wurde das Au-Ag im Dichtebereich von 1,18 - 1,22 der CsCl-Gradienten nachgewiesen (Tabelle 7 und 8, Abb. 14 und 15). Ein Immunoelktrophorese-Test mit den Fraktionen der Dichtegradienten ergab, daß das Antigen durch diese Prozedur eine weitere Reinigung erfahren hatte. Trotzdem sind noch Spuren von verunreinigenden Proteinen sichtbar (Abb. 23 u. 24), die möglicherweise aus gleich dichten Teilchen bestehen. Wie schon erwähnt, erfordert die Dichtegradienten-Zentrifugation einen erheblichen Zeit- und technischen Aufwand, bei dem trotzdem nur sehr kleine Mengen von gereinigtem Antigen erhalten werden.

Abb. 23: Immunelektrophorese mit der Fraktionen 8 - 11 der Dichtegradienten der Probe 2509.

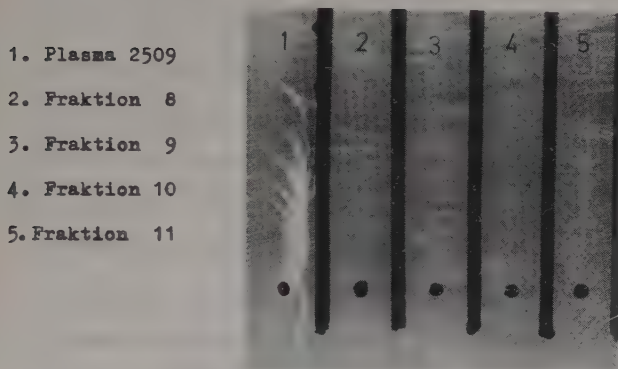
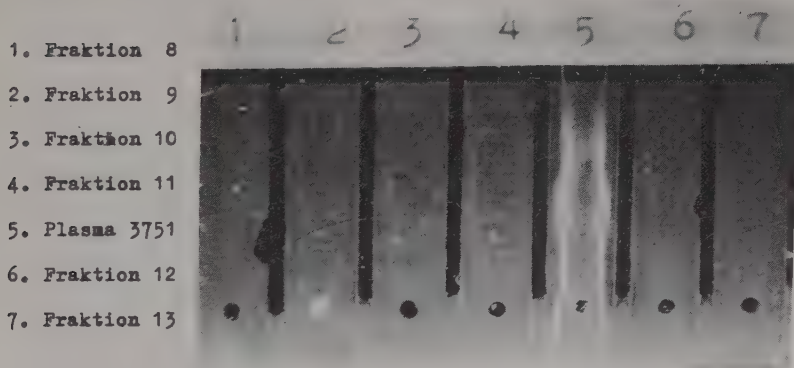


Abb. 24: Immunelektrophorese mit der Fraktionen 8 - 13 der Dichtegradienten der Probe 3751.



Deshalb wurde als weitere Reinigungsprozedur eine zweite Säulenchromatographie mit Sepharose 4 B durchgeführt. Dieses Material besteht aus Agarose, also einem linearen Polysaccharid, das frei von ionisierbaren Gruppen ist. Im gequollenen Zustand weist das Gel eine erhebliche Porosität auf und ist somit für die Trennung von Makromolekülen sehr geeignet. Vom Hersteller wird der Trennbereich des Sepharose 4 B Gels für Proteine mit einem Molekulargewicht von 10^5 bis $20 \cdot 10^6$ angegeben. In den Sepharose 4 B-Trennkurven der durch Sephadex G 200 vorgereinigten Proben wurden insgesamt drei Peaks festgestellt. Das Au-Ag konnte eindeutig im zweiten Peak nachgewiesen werden (Abb. 16).

DUIJEL et al. (32) verwendeten ebenfalls Sepharose 4 B Gel zur chromatographischen Trennung von Au-Ag-positiven Serumproben, die jedoch mit Freon und Aerosil vorbehandelt worden waren. Die von den Autoren abgebildete Trennungskurve erbrachte einen großen Peak. In 14 Fraktionen seines stufenförmigen Anstieges fand sich das Au-Ag, anfänglich weitgehend frei von Serumproteinen. PORTOCALA et al. (70) arbeiteten ebenfalls mit mehreren Trennungsverfahren. Bei dem Versuch Au-Ag-positives Serum an 5%igem Agarose-Gel bzw. Sepharose 2 B zu trennen, fanden sie das Antigen in denjenigen Fraktionen, die das Ende des Aufstiegs des breiten Peaks ausmachten, der bei ihren Trennversuchen entstand. Hierbei ist zu erkennen, daß das Sepharose-Gel mit seiner starken Porosität eine gute Trennung von hochmolekularen Teilchen ergibt, jedoch vorher nicht entfernte Teilchen

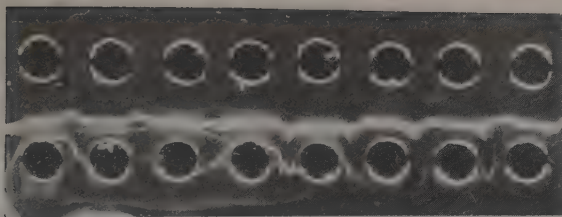
mit niederem Molekulargewicht die klare Trennung undeutlich machen. Diese Schwierigkeit verhinderte ich dadurch, daß ich die Proben zuerst einer Trennung durch Sephadex G 200 unterwarf und somit eine Kombination von Trennungen - zuerst an Sephadex G 200 - und anschließend an Sepharose 4 B - durchführte. Diese Kombination von zwei chromatographischen Trennungen an Gele mit verschiedenen Trennfähigkeiten verbesserte den Reinigungseffekt erheblich. Eine völlige Trennung des Au-Ag von den begleitenden etwa gleichgroßen Makromolekülen, insbesondere den reichlich vorhandenen Alpha-2-Makroglobulinen (MG = 900 000) wurde nicht erreicht (Abb. 19). Dagegen konnte eine Trennung des Antigens von den Alpha-2-Lipoproteinen (MG = 1 300 000) festgestellt werden. Eine weitgehende Reindarstellung des Antigens für analytische Untersuchungen durch mehrere Reinigungsschritte wie Gelfiltration, Dichtegradienten-Zentrifugation und anschließende Kombinierung von Isoelektrofokussierung mit Gelfiltration in Polyacrylamid-Gele wäre zu erreichen gewesen. Bei jedem dieser Reinigungsschritte mußte jedoch mit einem erheblichen Antigenverlust gerechnet werden. Mein Ziel dagegen war die Trennung und Reinigung des Antigens aus einzelnen Plasmaproben in Mengen, die zur Immunisierung von mehreren Versuchstieren ausreichten. Bei dem niederen Antigen-Titer des Ausgangsmaterials mußte deshalb auf eine hochgradige Reinigung verzichtet werden.

Versuche zur Herstellung von Antiseren mit Au-Ag wurden schon kurz nach seiner Entdeckung unternommen. 1966 impften MELARTIN und BLUMBERG (58) unbehandelte, native Seren von Au-Ag-Trägern in Kaninchen und erhielten nach Adsorption brauchbare Antiseren. Später reinigten viele Autoren (6, 12, 32, 39, 57, 60) das Au-Ag partiell und immunisierten mit diesem Material Tiere wie Ziege, Pferd, Schaf und Meerschweinchen. Dabei wurde immer wieder betont, daß Au-Ag nur ein schwaches Antigen darstelle. Trotz aller Bemühungen war man jeweils gezwungen, die nicht spezifischen präzipitierenden Antikörper durch Adsorption mit humanem Plasma oder -Serum aus den Antiseren zu entfernen.

Die von mir hergestellten Antiseren zeigten trotz der verschiedensten Reinigungsschritte ebenfalls noch Präzipitationsreaktionen gegen normales humanes Plasma. Deshalb war auch ich genötigt, meine Antiseren mit humanem Normalplasma zu absorbieren.

Der Erfolg dieses Vorgehens war im IDT und EPT deutlich zu erkennen und ist in den Abb. 25 und 26 photographisch festgehalten.

vor



nach

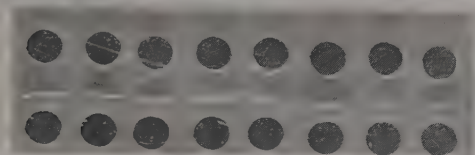
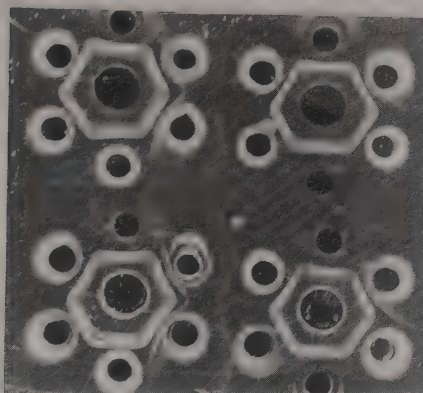


Abb.25 Elektrophoretischer Präzipitationstest mit den aus Meerschweinchen hergestellten Antiseren vor und nach Absorption mit Au-Ag-negativem Humanplasma.

vor



nach

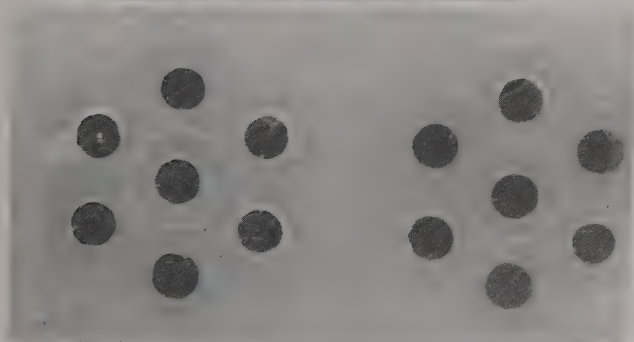


Abb. 26 Immunodiffusionstest mit den aus Meerschweinchen hergestellten Antiseren vor und nach Absorption mit Au-Ag-negativem Humanplasma.

(Zentrum = Au-Ag-haltige Probe
äußere Löcher = Antikörper-positive Antiseren)

E. ZUSAMMENFASSUNG

Auf der Suche nach genetisch bedingten Isopräzipitinen, bei denen die Seren vielfachtransfundierter Menschen gegen die Seren von Normalpersonen getestet wurden, entdeckte man das Australia-Antigen (= Au-Ag) im Serum eines australischen Ureinwohners. Später stellte man die Assoziation des Antigens mit der akuten Virus-Hepatitis fest.

Für eine Charakterisierung der biophysikalischen, biochemischen und der serologischen Eigenschaften des Au-Ag, ferner für die Herstellung monospezifischer Antiseren, ist die Reindarstellung und Konzentrierung des Antigens ein wichtiger Schritt.

Die Reindarstellung des hauptsächlich aus Protein bestehenden Antigens aus einem Gemisch von Proteinen des menschlichen Plasmas stößt auf erhebliche Schwierigkeiten. Außerdem reagieren Proteine auf Grund ihres Aufbaus gegenüber vielen Methoden der Chemie oder physikalischen Chemie sehr empfindlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung, Reindarstellung und Konzentrierung des Protein-ähnlichen Au-Ag aus dem "Proteingemisch" Plasma versucht.

Die Untersuchung von mehreren tausend Blutproben von normalen Blutspendern führte zur Beschaffung von 15 Au-Ag-positiven Konserven. 8 von diesen zeigten eine brauch-

bare Au-Ag-Konzentration und wurden für die vorliegenden Versuche ausgewählt.

Die Reinigung und Konzentrierung des Antigens wurde auf folgende Weise angestrebt:

1. Fraktionierte Ausfällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung
2. Gelfiltration mit dem Sephadex G 200 kombiniert mit Sepharose 4 B
3. Fällung der Begleitproteine (Globuline) durch Salzentzug
4. Ausschleudern und Trennung durch Ultrazentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation
5. Konzentrierung mit Polyäthylenglycol 20 000.

Ohne Schwierigkeiten konnte eine Trennung des Antigens von Plasmaproteinen mit mittlerem und niederem Molekulargewicht erreicht werden. Bei den hochmolekularen Eiweißen dagegen wurde nur eine partielle Trennung erreicht, weshalb die von mir in Meerschweinchen hergestellten Antiseren zur Entfernung von nicht Au-Ag-spezifisch präzipitierenden Antikörpern mit normalem Human-Plasma adsorbiert werden mußten.

L i t e r a t u r

1. ALLISON, A.C., BLUMBERG, B.S.:
Isoprecipitation reaction distinguishing human
serum-protein types.
Lancet I, 634-637 (1961)
2. ALMEIDA, J.D., WATERSON, A.P.:
Immune complexes in hepatitis.
Lancet II, 983-986 (1969)
3. ALMEIDA, J.D., ZUCKERMAN, A.J., TAYLOR, P.E., WATERSON, A.P.:
Immune electron microscopy of the Australia-SH (serum
hepatitis) antigen.
Microbios 2, (117-123 (1969)
4. ALTER, H.J., BLUMBERG, B.S.:
Further studies on a "new" human isoprecipitin system
(Australia antigen).
Blood 27, 297-309 (1966)
5. ANDRASSY, K., RITZ, E., SANWALD, R.:
Australia-Antigen-Nachweis in Fibrinogenkonzentraten
und anderen gerinnungsaktiven Proteinen.
Dtsch. med. Wschr. 95, 2467-2469 (1970)
6. ARNAUD, R., MAUPAS, P., AUDURIER, A., AVRIL, J., RAYNAUD, B.:
Hyperimmunization of rabbits with Australia antigen.
Vox Sang. (Basel) 19, 276-277 (1970)
7. BARKER, L.F., SMITH, K.O., GRHLE, W.D., SHULMAN, N.R.:
Some antigenic and physical properties of virus-
like particles in sera of hepatitis patients.
J. Immunol. 102, 1529-1532 (1969)

8. BARKER, L.F., SHULMAN, N.R., MURRAY, R., HIRSCHMAN, R.J.,
RATNER, F., DIEFENBACH, W.C., GELLER, H.M.:
Transmission of serum hepatitis. Evidence of
association with 20 mu virus-like particles.
J. Amer. med. Ass. 211, 1509-1512 (1970)
9. BARKER, L.F., PETERSON, M.R., MURRAY, R.:
Application of the microtiter complement fixation
technique to studies of hepatitis associated antigen
in human hepatitis.
Vox Sang. (Basel) 19, 211 (1970)
10. BAYER, M.E., BLUMBERG, B.S., WERNER, B.:
Particles associated with Australia antigen in the
sera of patients with leukemia, Down's syndrome
and hepatitis.
Nature (Lond.) 218, 1057-1059 (1968)
11. BECK, H., SCHMITT, H., STÜRNER, K.H.:
Au/SH-antigen in human plasma fractions.
Vox Sang. (Basel) 20, 281-282 (1971)
12. BECKER, W., BONACKER, L.:
Precipitating heterologous antisera for the
detection of Au/SH-Antigen.
Vox Sang. (Basel) 19, 273-275 (1970)
13. BECKER, W., BONACKER, L., SCHWICK, H.G.:
Ein einfacher immunologischer Schnelltest zum
Nachweis des Au/SH-Antigens.
Klin. Wschr. 48, 887-888 (1970)
14. BERG, R., BJÖRLING, H., BERNTSEN, K., ESPMARK, A.:
Recovery of Australia antigen from human plasma pro-
ducts separated by a modification Cohn fractionation.
Vox Sang. (Basel) 27, 1-13 (1972)

15. BERTHOLD, H., KLEINE, N., MÜLLER, G.:
Au-Antigen und Transfusionshepatitis. Eine prospektive Studie zur Häufigkeit und Prophylaxe der Transfusionshepatitis.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. A, 220, 230-234 (1972)
16. BLUMBERG, B.S., DRAY, S., ROBINSON, J.C.:
Antigen polymorphism of a low-density beta-lipoprotein. Allotypy in human serum.
Nature (Lond.) 194, 656-658 (1962)
17. BLUMBERG, B.S., RIDDELL, N.M.:
Inherited antigenic differences in human serum beta lipoproteins. A second antiserum.
J. clin. Invest. 42, 867-875 (1963)
18. BLUMBERG, B.S.:
Polymorphismus of the serum proteins and the development of iso-precipitins in transfused patients.
Bull. N.Y. Acad. Med. 40, 377-386 (1964)
19. BLUMBERG, B.S., ALTER, H.J., VISNICK, S.:
A "new" antigen in leukemia sera.
J. Amer. med. Ass. 191, 541-546 (1965)
20. BLUMBERG, B.S., MELARTIN, L., GUINTO, R.A., WERNER, B.:
Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen).
Amer. J. hum. Genet. 18, 594-608 (1966)
21. BLUMBERG, B.S., GERSTLEY, B.J.S., HUNGERFORD, D.A., LONDON, W.T., SUTNICK, A.I.:
A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis.
Ann. intern. Med. 66, 924-930 (1967)

22. BLUMBERG, B.S., MELARTIN, L., LECHAT, M., GUINTO, R.A.:
Association between lepromatous leprosy and
Australia antigen.
Lancet II, 173-176 (1967)
23. BLUMBERG, B.S., SUTNICK, A.I., LONDON, W.T.:
Hepatitis and leukemia: their relation to Australia
antigen.
Bull. N.Y. Acad. Med. 44, 566 (1968)
24. BLUMBERG, B.S., FRIEDLAENDER, J.S., WOODSIDE, A.,
SUTNICK, A.I., LONDON, W.T.:
Hepatitis and Australia antigen: Autosomal recessive
inheritance of susceptibility to infection in humans.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 62, 1108-1115 (1969)
25. BLUMBERG, B.S., SUTNICK, A.I., LONDON, W.T.:
Australia antigen as a hepatitis virus variation in
host response.
Amer. J. Med. 48, 1-8 (1970)
26. BÖHME, U., HÖHER, P.G., KUWERT, E.:
Molekulargewicht der 20 nm-Partikel des Au/SH-
Antigens.
Arch. ges. Virusforsch. 39, 393-395 (1972)
27. BUSSART, A.:
Description d'une technique combinant simultanément
l'électrophorèse et la précipitation immunologique
dans un gel: L'électrosynérèse.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 34, 258-260 (1959)
28. DANE, D.S., CAMERON, C.H., BRIGGS, M.:
Virus-like particles in serum of patients with
Australia-antigen-associated hepatitis.
Lancet I, 695-698 (1970)

29. DARDANONI, L., PAGLIARO, L., SPANO, C.:
Complement fixation test in the study of Australia antigen.
Arch. ges. Virusforsch. 34, 51-63 (1971)
30. DEUTSCH, G.F., SPENCE, L.:
Virus-like particles in the liver and their relationship to Australia antigen.
Lancet I, 447 (1972)
31. DREESMAN, G.R., HOLLINGER, F.B., McCOMBS, R.M.,
MELNICK, J.L.:
Production of potent anti-Australia-antigen sera of high specificity and sensitivity in goats.
Infect. Immunity 5, 213-221 (1972)
32. DUIMEL, W.J.M., BRUMMELHUIS, H.G.J., KRIJNEN, H.W.:
The purification of hepatitis-associated antigen (HAA/SH/Au) from human serum and the preparation of a sheep anti-HAA-serum.
Vox Sang. (Basel) 23, 249-255 (1972)
33. FLODIN, P., KILLANDER, J.:
Fraktionation of human serum proteins by gel filtration.
Biochim. biophys. Acta 63, 403-410 (1962)
34. FULTON, F., DUMBELL, K.R.:
The serological comparison of strains of influenza virus.
J. gen. Microbiol. 3, 97-110 (1949)
35. GERIN, J.L., HOLLAND, P.V., PURCELL, R.H.:
Australia antigen: Large-scale purification from human serum and biological studies of its proteins.
J. Virol. 7, 569-577 (1971)

36. GERIN, J.L., PURCELL, R.H., HOGGAN, M.D., HOLLAND, P.V.,
CHANOCK, R.M.:
Biophysical properties of Australia antigen.
J. Virol. 4, 763-768 (1969)
37. GILES, J.P., MCCOLLUM, R.W., BERNDTSON, L.W., KRUGMAN, S.:
Viral hepatitis: Relation of Australia SH antigen
to the Willowbrook Ms-2 strain.
New Engl. J. Med. 281, 119-122 (1969)
38. GNAN, F., FELKL, W., KRASNITZKY, O., PESENDORFER, F.,
WEWALKA, F.:
Au/SH-Antigen Untersuchungen bei akuter Virushepatitis.
V. Internat. Kongr. f. Infektionskrankheiten 31.8. -
5.9.1972, Wien
39. GOCKE, D.J., KAVEY, N.B.:
Hepatitis antigen: Correlation with disease and
infectivity of blood donors.
Lancet I, 1055-1059 (1969)
40. GOCKE, D.J., HOWE, C.:
Rapid detection of Australia antigen by counter-
immuno-electrophoresis.
J. Immunol. 101, 1031-1032 (1970)
41. GRAHAM, H.A., ALDENDERFER, P.H.:
A counterimmuno-electrophoresis inhibition test for
the detection of hepatitis-associated antigen.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 139, 414 (1972)
42. HAAN, J., LANG, N.:
Quantitative Bestimmung der Antigenbindung in
Antigen-Antikörper-Komplex mit der Überwanderungs-
elektrophorese.
Klin. Wschr. 35, 1013-1016 (1957)

43. HENNEY, C.S., ISHIZAKA, K.A.:
A simplified procedure for the preparation of
immunoglobulin-class-specific-antisera.
J. Immunol. 103, 56-61 (1969)
44. HENIGST, W., ABAR, B.:
Australia/SH-Antigen und Virus-Hepatitis.
Münch. med. Wschr. 36, 1160-1184 (1971)
45. HENIGST, W., ABAR, B.:
Langdauernde Ausscheidung von Australia- (SH-, HA)
Antigen im Urin Hepatitiskranker.
Med. Klin. 68, 404-408 (1973)
46. HOREJSI, J., KORINEK, J.:
Fraktionierung des AuA enthaltenden Plasmas mittels
Rivanol und Chromatographie auf Sephadex.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. A, 220, 513-518 (1972)
47. HORST, H., TRIPATZIS, I., KONSTANTINIDIS, I.:
Australia-Antigen: Wirkung chemischer und physika-
lischer Maßnahmen auf die Antigenität.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. A 219, 1-6 (1972)
48. HUNTER, J.R.:
Photographic recording of agar diffusion plates.
Nature 183, 1283-1287 (1959)
49. JOKELAINEN, P.T., KROHN, K., PRINCE, A.M., FINLAYSON,
N.D.C.:
Electron microscopic observation on virus-like
particles associated with SH-antigen.
J. Virol. 6, 685 (1970)
50. KABAT, E.A., MAYER, M.M.:
Experimental Immunochemistry, 2nd ed., pp. 209
(Thomas, Springfield 1961)

51. KABOTH, U., SCHÖBER, A., ARNDT, H.J., VIDO, I., SELMAIR, H., GALLASCH, E., VERMA, P., THOMSEN, R., CREUTZFELDT, W.:
Australia (SH)-Antigen-Befunde bei Leberkranken und Blutspendern.
Dtsch. med. Wschr. 95, 2157-2164 (1970)
52. KAPP, J.-F., HÖHER, P.G., KUWERT, E., THRAENNART, O., PPAR, D., HENGSTENBACH, W., ROGGENBACH, H.-J.:
Eine sensible Komplementbindungsreaktion (KBR) zum Nachweis des Au/SH-Antigens und ihr Vergleich mit dem Agartest und Gegenstromelektrophorese.
Med. Mikrobiol. Immunol. 157, 58-79 (1971)
53. KILLANDER, J., BENGTSSON, S., PHILIPSON, L.:
Fraktionation of human plasma macroglobulins by gel filtration on pearlcondensed agar.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 115, 861-865 (1964)
54. LANGE, W., KÖHLER, H., APODACA, J.:
Zum Verhalten von Hepatitis Associated Antigen (HAA) bei Patienten mit Virushepatitis.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. A, 215, 153-165 (1970)
55. Le BOUVIER, G.L.:
The heterogeneity of Australia antigen.
J. infect. Dis. 123, 671-675 (1971)
56. LENETTE, E.H.:
Diagnostic procedures for viral and rickettial infections. 4. Ed., P. 52 American Public Health Association, Inc., New York 1969
57. MADALINSKI, K., KRAWCZYNSKI, K., SZTACHELSKA, A., SWIDERSKA, H., DOBRZYNSKI, L.:
A simple procedure for preparation of antiserum to hepatitis-associated antigen by use of immune tolerance to serum proteins.
J. infect. Dis. 124, 517 (1971)

58. MELARTIN, L., BLUMBERG, B.S.:
Production of antibody against "Australia antigen"
in rabbits.
Nature (Lond.) 210, 1340-1341 (1966)
59. MILLMAN, I., LOEB, L.A., BAYER, M.E., BLUMBERG, B.S.:
Australia antigen (a hepatitis-associated antigen)
purification and physical properties.
J. exp. Med. 131, 1190-1199 (1970)
60. NARIUCHI, H., USUI, M., MATUHASI, T.:
A simple method for preparation of anti-Australia-
antigen serum.
Vox. Sang. (Basel) 20, 283-285 (1971)
61. OUCHTERLONY, Ö.:
Antigen-antibody reaction in gels.
Acta path. microbiol. scand. 26, 507-515 (1949)
62. OUCHTERLONY, Ö.:
Antigen-antibody reaction in gels.
II. Factors determining the site of the precipitate.
Arkiv för kemi 1, 43-54 (1949)
63. OUCHTERLONY, Ö.:
Antigen-antibody reaction in gels, .III. The
time factor.
Arkiv för Kemi 1, 55-59 (1949)
64. OUCHTERLONY, Ö.:
Antigen-antibody reaction in gels, IV. Types
of reactions in coordinated systems of diffusion.
Acta path. microbiol. scand. 32, 231-239 (1953)
65. OUCHTERLONY, Ö.:
Diffusion- in-gel methods for immunological analysis.
Progr. Allergy 5, 1-12 (1958)

66. OUCHTERLONY, Ö.:

Diffusion- in-gel methods for immunological analysis.
Progr. Allergy 6, 30-39 (1962)

67. OUDIN, J.:

Methode d'analyse immunochimique par precipitation
specifique en milieu gelifie.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 222, 115-122 (1946)

68. PESENDORFER, F., KRASSNITZKY, O., WEWALKA, F.:

Immunelektrophoretischer Nachweis von "Hepatitis-
Associated-Antigen" (Au/SH-Antigen).
Klin. Wschr. 48, 58 (1970)

69. PIKE, R., OWENS, H., HUMES, D.:

The plate complement fixation test with leptospiral antigens.
J. Lab. clin. Med. 44, 609-620 (1954)

70. PORTOCALA, R., POPA, L.M., REPANOVICI, R.:

Some physico-chemical properties of Australia-
antigen: investigations by gel filtration, polyacrylamide and agarose gel electrophoresis, adsorption and specific precipitation.
Acta Virol. 16, 191-200 (1972)

71. PRINCE, A.M.:

An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 60, 814-821 (1968)

72. PRINCE, A.M.:

Relation of Australia and SH antigens.
Lancet II, 462-463 (1968)

73. PRINCE, A.M., BURKE, K.:
Serum hepatitis antigen (SH): Rapid detection by
high voltage immuno-elektroosmophoresis.
Science 169, 593 (1970)
74. PURCELL, R.H., HOLLAND, P.V., WALSH, J.H., WONG, D.C.,
MORROW, A.G., CHANOCK, R.M.:
A complement-fixation test for measuring Australia
antigen and antibody.
J. infec. Dis. 120, 383-386 (1969)
75. PURCELL, R.H., GERIN, J.L., HOLLAND, P.V., CLINE, W.L.,
CHANOCK, R.M.:
Preparation and characterization of complement-
fixing hepatitis-associated antigen and antiserum.
J. infect. Dis. 121, 222-226 (1970)
76. SANWALD, R., RITZ, E., RAPP, W., ANDRASSY, K.,
KOMMERELL, B.:
SH-Antigen bei Dauerdialyse-Patienten.
Dtsch. med. Wschr. 95, 253-256 (1970)
77. SCHMIDT, N.J., LENNETTE, E.H.:
Complement fixation and immunodiffusion tests for
assay of hepatitis-associated "Australia" antigen
and antibodies.
J. Immunol. 105, 604 - 613 (1970)
78. SCHOBER, A., SUNDMACHER, R., THOMSSSEN, R., DREES, O.:
Sedimentation constant of hepatitis-associated
antigen.
Arch. ges. Virusforsch. 35, 314-316 (1971)
79. SCHROEDER, D.D., MOZEN, M.M.:
Australia antigen: Distribution during Cohn
ethanol fractionation of human plasma.
Science 168, 1462-1463 (1970)

80. SEVER, J.L.:

Application of a microtechnique to viral serological investigations.

J. Immunol. 88, 320-329 (1962)

81. SHULMAN, N.R., BARKER, L.F.:

Virus-like antigen, antibody and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation.

Science 165, 304-306 (1969)

82. SHULMAN, N.R., HIRSCHMAN, R.J., BARKER, L.F.:

Viral hepatitis.

Ann. intern. Med. 172, 257-269 (1970)

83. STURGEON, P., KWAK, K.S., GITNICK, G.:

Australia antigen detection by a rapid automated complement fixation method.

Vox. Sang. (Basel), 20, 533-541 (1971)

84. SUTNICK, A.I., LONDON, W.T., GERSTLEY, B.J.S.,

CRONLAND, M.M., BLUMBERG, B.S.:

Anicteric hepatitis associated with Australia antigen.

J. Amer. med. Ass. 205, 670 (1968)

85. TAKATSY, G.:

Recent studies of the antigenic structures of influenza virus by the antibody absorption test.

Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 3, 191-203 (1955)

86. TAYLOR, P.E., ZUCKERMAN, A.J.:

Studies of viral hepatitis in Great Britain.

V. Internat. Kongr. f. Infektionskrkht. 31.8. -

5.9.1972, Wien

87. TURNER, G.C., WHITE, G.B.:

SH antigen in haemodialysis-associated hepatitis.

Lancet II, 121 (1969)

88. WASSERMAN, E., LEVINE, L.:

Quantitative micro-complement fixation and its use
in the study of antigenic structure by specific
antigen-antibody inhibition.

J. Immunol. 87, 290-295 (1961)

89. WILLEMS, F.Th.C., KUNST, V.A.J.M., ROSIER, J.G.M.C.:

Complement-fixation test for Australia-antigen.

Lancet I, 953 (1970)

90. WRIGHT, R., MCCOLLUM, R.W., KLATSKIN, G.:

Australia antigen in acute and chronic liverdisease.

Lancet II, 117-124 (1969)

91. ZUCKERMAN, A.J., TAYLOR, P.E.:

Persistence of the serum hepatitis (AH-Australia)-
antigen for many years.

Nature (Lond.) 223, 81-82 (1969)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. phil. nat., Dr. med. H. Eyer herzlich dafür danken, daß er es mir ermöglicht hat, während meiner Tätigkeit als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten an seinem Institut diese Arbeit anzufertigen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Henigst danke ich für die Überlassung des Themas und die persönlichen Anregungen und Bemühungen bei der Beschaffung von Plasmaproben, ferner für das zur Verfügungstellen eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung.

L e b e n s l a u f

Am 14.4.1940 wurde ich als Sohn des Elektro-Ing. Dawud Abar und dessen Ehefrau Asly, geb. Schirinsade, in Teheran/Iran geboren.

Von 1946 bis 1952 besuchte ich die Grundschule und von 1952 bis 1958 die Oberschule in Teheran.

Von Nov. 1959 bis Juli 1962 studierte ich Landwirtschaft an der Technischen Hochschule München.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Biologie, das ich 1968 mit der Diplomhauptprüfung abschloß. Ende 1969 erlangte ich durch Einreichung meiner Diplomarbeit mit dem Titel "Experimentelle Untersuchungen über ein Verfahren zur orientierenden Bestimmung der Größe oder Dichte von Viren" den Grad eines Diplom-Biologen.

Seit 1. Dezember 1969 bin ich als Wissenschaftlicher Angestellter und seit 15. Mai 1972 als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten an der Virologischen Abteilung des Max von Pettenkofer Institutes für Hygiene und Medizinischen Mikrobiologie der Universität München tätig. Während dieser Zeit veröffentlichte ich auf Anregung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Henigst die vorliegende Promotionsarbeit.

Seit 8. September 1967 bin ich mit Dr. med. Eschratte, geb. Atai verheiratet.

